

# **Charakterisierung von Plasmazellsubpopulationen im humanen Knochenmark – Vergleich von CD19-exprimierenden und CD19-nicht exprimierenden Plasmazellen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades  
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m  
(Dr. rer. nat.)

im Fach  
Immunologie

eingereicht an der  
Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Diplom-Molekularmedizinerin Ina Kruck, geb. Wirries

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät  
Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andreas Radbruch
2. Prof. Dr. Thomas Dörner
3. Prof. Dr. Hans-Martin Jäck

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Oktober 2015



## ZUSAMMENFASSUNG

Plasmazellen (PZ) sind Effektorzellen des adaptiven Immunsystems, die durch Produktion und Sekretion von Antikörpern zur Immunabwehr beitragen. Im Rahmen von Immunantworten können Plasmablasten aus B-Zellen nach Aktivierung differenzieren und in das Knochenmark (KM) einwandern. Es wird angenommen, dass sie sich dort in sogenannten Überlebensnischen niederlassen und zu langlebigen PZ entwickeln. Im Ergebnis führt dies zur kontinuierlichen Bereitstellung von Antikörpern und zur Aufrechterhaltung des humoralen Immungedächtnisses. Obwohl in den letzten Jahren durch präklinische Experimente in der Maus Fortschritte in der Aufklärung der PZ Entwicklung und der Zusammensetzung der PZ Nische im KM verzeichnet wurden, sind insbesondere im humanen System viele Fragen bezüglich der PZ Biologie einschließlich möglicher PZ Subpopulationen, ihrer Homöostase und ihrer Ansiedelung in Überlebensnischen des KM nach wie vor ungeklärt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der molekularbiologischen, phänotypischen und funktionellen Charakterisierung von reifen PZ Populationen im menschlichen KM, die sich insbesondere durch die Expression des Oberflächenmarkers CD19 unterscheiden. CD19 gilt als modulierender Ko-Rezeptor des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs und wird spezifisch auf B-Zellen exprimiert.

Um einen ersten Einblick in mögliche biologische Unterschiede von CD19-exprimierenden (CD19<sup>+</sup>) und CD19-nicht exprimierenden (CD19<sup>(-)</sup>) KM PZ zu erhalten, wurde eine Genexpressionsanalyse und durchflusszytometrische Phänotypisierung der beiden PZ Subpopulationen durchgeführt. Diese ergab, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ durch geringere Expression von CD45, HLADR und CD95 sowie stärkere Expression von HLA-ABC, Bcl2 und CD28 einen höheren Reifegrad aufweisen und eine tendenziell bessere Überlebensfähigkeit besitzen als CD19<sup>+</sup> KM PZ. Zudem wurde nachgewiesen, dass sich beide PZ Populationen in der Expression von Adhäsions- und Migrationsmolekülen wie CD9, CD99, CCR10,  $\beta$ 7-Integrin, CD146, CD44 und CD56 unterscheiden. Diese Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass innerhalb des reifen PZ Pools im KM verschiedene Differenzierungsstufen vertreten sein können und PZ Subpopulationen möglicherweise in unterschiedlichen Nischen des KM lokalisiert sind.

Funktionelle Analysen zeigten weiterhin, dass beide PZ Populationen vergleichbar antigenspezifische Zellen gegen Tetanus, Mumps, Masern und EBV enthalten. Sekundäre Immunisierung von gesunden Probanden mit Tetanustoxoid-Impfstoff (TT) führte zur Entwicklung CD19<sup>+</sup>/HLADR<sup>stark</sup> exprimierender Plasmablasten (PB) und zur Freisetzung reifer CD19<sup>+</sup>/HLADR<sup>gering</sup> PZ ins Blut, während CD19<sup>(-)</sup> PB/PZ nach sekundärer TT-Vakzinierung im Blut nicht nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich wurden im KM von Säuglingen ausschließlich CD19<sup>+</sup> PZ detektiert. Diese Resultate sprechen für eine sukzessive Entwicklung von CD19<sup>(-)</sup> PZ aus CD19<sup>+</sup> PZ *in situ* im KM und weisen darauf hin, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine stabile Komponente des adaptiven Immunsystems bilden, während CD19<sup>+</sup> KM PZ eine eher dynamische PZ

Population darstellen, die eine Anpassung des humoralen Immunsystems an neue Pathogene auch im Erwachsenenalter ermöglicht. Somit wird gleichzeitig sowohl eine Adaptation als auch die Stabilität des humoralen Immungedächtnisses gewährleistet.

Hinsichtlich der terminalen Differenzierung von KM PZ fanden sich keine sicheren Hinweise für eine Beteiligung des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs an der Differenzierung von CD19<sup>+</sup> KM PZ zu CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, während erste Stimulationsversuche mit Anti-CD19-Antikörpern auf die Funktionalität von CD19 auf KM PZ hinweisen und Gegenstand aktueller Untersuchungen sind.

Die vorliegende Arbeit gibt erstmals detailliert Auskunft über die Charakteristika von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> PZ im humanen KM gesunder Probanden und bietet eine vergleichende Analyse beider PZ Populationen sowohl in molekularbiologischer, als auch funktioneller Hinsicht. Die Ergebnisse geben Einblick in die Heterogenität von KM PZ als zelluläre Grundlage des humoralen adaptiven Immungedächtnisses und die differenzielle Bedeutung verschiedener PZ Populationen für dessen Stabilität und Anpassung.

**Schlagwörter:** humorales Immungedächtnis, Plasmablast, Plasmazelle, Knochenmark, CD19, Differenzierung, Zellmigration, Zelladhäsion, Apoptose, Überleben, Tetanusimmunisierung, Stimulation, Adaption, Stabilität, Dynamik



## ABSTRACT

Plasma cells (PC) are terminally differentiated effector cells of the adaptive immune system that contribute to the defense of pathogens through production and secretion of antibodies. During immune responses, activated B-cells can differentiate into plasmablasts, which then home to the bone marrow (BM), where they settle in so called “survival niches” and may further mature into long-lived plasma cells. It is believed that the continuous secretion of antibodies by long-lived PC leads to the maintenance of humoral memory. While preclinical studies in mice have contributed to a better understanding of PC development and organization of the PC survival niche, particularly little is known about the biology of human PC, their potential subsets, homeostasis and settlement in the BM.

This thesis addresses the biomolecular, phenotypical and functional characterization of mature PC subsets in the human BM that particularly differ in their expression of CD19. CD19 is described as a modulating co-receptor of the B-cell receptor signaling pathway and is considered a marker of the B-cell lineage.

To gain insight into possible biological differences between BM PC expressing or lacking CD19 expression, respectively, gene expression analysis and flow cytometry were performed. CD19-negative (CD19<sup>(-)</sup>) BM PC showed lower expression of CD45, HLADR and CD95 and higher expression of HLA-ABC, Bcl2 and CD28 as compared to CD19-positive (CD19<sup>(+)</sup>) BM PC, indicating higher maturity and a trend towards better survival of the former PC subset. Furthermore, both BM PC subsets showed distinct expression profiles of molecules involved in adhesion and migration, such as CD9, CD99, CCR10,  $\beta$ 7 integrine, CD146, CD44 and CD56. These results provide a first indication that mature BM PC could further be subdivided into distinct differential stages and that PC subsets may be located in different niches of the BM.

Functional analyses revealed similar antigen specificities in CD19<sup>(+)</sup> and CD19<sup>(-)</sup> BM PC, i.e. antibodies against tetanus, mumps, measles and EBV. After secondary vaccination of healthy subjects with tetanus vaccine, newly generated, antigen-specific HLADR<sup>high</sup> plasmablasts expressing CD19 were detectable in peripheral blood as well as CD19<sup>(+)</sup>/HLADR<sup>low</sup> mature PC which were probably released from the BM. CD19<sup>(-)</sup> PB/PC were virtually absent in peripheral blood during secondary immune response to tetanus vaccine. Moreover, PC detectable in infant BM exclusively expressed CD19. These results argue for a gradual differentiation of CD19<sup>(+)</sup> BM PC into CD19<sup>(-)</sup> BM PC *in situ* and suggest CD19<sup>(-)</sup> BM PC as a more stable component of the adaptive immune system, whereas CD19<sup>(+)</sup> BM PC represent a more dynamic PC population which enables the immune system to adapt to new challenges throughout a lifetime.

*In vitro* stimulation of BM PC did not show reliable indication of a contribution of the B-cell receptor pathway to the terminal differentiation of CD19<sup>(+)</sup> into CD19<sup>(-)</sup> BM PC. However, stimulation with anti-CD19-antibodies provided first evidence of functional CD19 on BM PC and is subject to further investigations.

The present work gives insight into characteristic features of CD19<sup>+</sup> and CD19<sup>(-)</sup> PC in human BM for the first time and contains biomolecular and functional analyses allowing a detailed comparison of both PC subsets. The results provide information on the heterogeneity of BM PC and their differential contribution to the adaptation and stability of humoral memory.

**Keywords:** humoral memory, plasmablast, plasma cell, bone marrow, CD19, differentiation, migration, adhesion, apoptosis, survival, tetanus vaccination, stimulation, adaptation, stability, dynamic

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 ANGEBORENES IMMUNSYSTEM.....	1
1.1.1 Zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems .....	1
1.1.2 Humorale Bestandteile des angeborenen Immunsystems .....	3
1.2 ADAPTIVES IMMUNSYSTEM .....	4
1.2.1 Bildung antigenspezifischer Rezeptoren auf B- und T-Zellen .....	4
1.2.2 Entwicklung von B- und T-Zellen .....	6
1.2.3 T-Zell-abhängige und T-Zell-unabhängige Immunantwort von folliculären B-Zellen .....	7
1.2.4 Regulation der Plasmazell-Reifung.....	10
1.3 DAS KNOCHENMARK ALS HAUPTSPEICHERORT LANGLEBIGER PLASMAZELLEN .....	12
1.3.1 Konzepte zur Kontrolle des humoralen Gedächtnisses durch Plasmazellhomöostase ..	12
1.3.2 Migration von Plasmablasten in das Knochenmark.....	13
1.3.3 Ansiedelung von Plasmazellen in Überlebensnischen.....	15
1.3.4 Überblick über bisher bekannte Signale, die das Überleben von Plasmazellen fördern	16
1.3.5 Zelluläre Komponenten der Überlebensnische von Plasmazellen .....	17
1.4 FUNKTION VON CD19 ALS KO-REZEPTOR DES B-ZELL-REZEPTOR-KOMPLEXES .....	19
1.4.1 Überblick über den B-Zell-Rezeptor-Signalweg .....	19
1.4.2 CD19 als aktivierender Ko-Rezeptor.....	20
1.4.3 Inhibitorische Ko-Rezeptoren .....	21
1.5 AUSGANGSLAGE UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	22
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
2.1 PROBENMATERIAL.....	24
2.2 LABORAUSRÜSTUNG .....	25
2.3 PUFFER UND MEDIEN.....	27
2.4 ZELLISOLATION.....	28
2.4.1 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation .....	28
2.4.2 Isolation von Zellen aus Knochenmark.....	28
2.4.3 Isolation von Zellen aus der Milz .....	28
2.5 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN.....	29
2.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie .....	29
2.5.2 Färbung von Zellen für durchflusszytometrische Analysen .....	31
2.5.3 Durchflusszytometrische Detektion von Plasmablasten und Plasmazellen .....	33
2.5.4 Zellzahlbestimmung mittels TruCOUNT-Methode .....	35
2.5.5 Plasmazell-Anreicherung per MACS und Sortierung von CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ mittels FACS.....	35
2.5.6 Durchflusszytometrische Messung von Zellen im Grundzustand.....	35
2.6 KULTIVIERUNG VON KM PZ MIT ÜBERLEBENSFÖRDERNDEN FAKTOREN .....	36
2.7 NACHWEIS SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER MITTELS ELISA .....	36
2.8 NACHWEIS ANTIGENSPEZIFISCHER ANTIKÖRPER-SEZERNIERENDER ZELLEN MITTELS ELISPOT .....	38
2.9 B-ZELL-REZEPTOR-STIMULATION .....	40
2.9.1 Nachweis der Funktionalität von Signalwegen durch PhosphoFlow.....	40

2.9.2	<i>Stimulation von KM-Zellen in Zellkultur</i> .....	42
2.10	REVERSE TRANSKRIPTION UND QUANTITATIVE <i>REALTIME</i> PCR .....	42
2.11	GENEXPRESSIONSANALYSE MITTELS MICROARRAY .....	44
2.12	MICRORNA-EXPRESSIONSANALYSE .....	46
2.13	WEITERE VERWENDETE PROGRAMME ZUR ANALYSE UND AUSWERTUNG DER DATEN .....	46
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>48</b>
3.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON CD19 <sup>+</sup> UND CD19 <sup>(-)</sup> KNOCHENMARK- PLASMAZELLEN .....	48
3.1.1	<i>Das menschliche Knochenmark ist Hauptspeicherort von CD19<sup>(-)</sup> Plasmazellen</i> .....	48
3.1.2	<i>Zusammenhang zwischen Alter und Geschlecht und der prozentualen Verteilung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ</i> .....	50
3.1.3	<i>Genexpressionsanalyse von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ</i> .....	52
3.1.3.1	Affymetrix-Genexpressionsanalyse ermittelt 689 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene zwischen CD19 <sup>+</sup> KM PZ versus CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ .....	52
3.1.3.2	Identifikation signifikant differenzieller funktioneller Gruppen mittels DAVID Bioinformatics Resources .....	55
3.1.3.3	GSEA-Analyse .....	56
3.1.4	<i>Phänotypische Charakterisierung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ mittels Durchflusszytometrie</i> .....	59
3.1.4.1	Expression von B-Zell- und Plasmazell-Markern .....	59
3.1.4.2	Untersuchung der Expression von Ki67 als Proliferationsmarker .....	62
3.1.4.3	Expression von Ko-Rezeptoren des CD19-Komplexes .....	64
3.1.4.4	Expression von Rezeptoren mit Einfluss auf B-Zell-Rezeptor- Signalwege .....	65
3.1.4.5	Expression von Adhäsionsmolekülen und Molekülen mit Einfluss auf das Migrationsverhalten von Zellen .....	66
3.1.4.6	Expression von Molekülen mit Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von Plasmazellen .....	71
3.1.4.7	Vergleich der Affymetrix-Daten mit den Ergebnissen aus der Durchflusszytometrie .....	72
3.1.5	<i>Expressionsanalyse von microRNAs bei CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ</i> .....	74
3.2	FUNKTIONELLE ANALYSEN VON CD19 <sup>+</sup> UND CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ .....	75
3.2.1	<i>Kultur von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ mit überlebensfördernden Faktoren</i> .....	75
3.2.2	<i>Untersuchungen zur Antigen-Spezifität von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ</i> .....	77
3.2.2.1	ELISpot .....	77
3.2.2.2	ELISA .....	78
3.2.3	<i>Untersuchung von Kinderknochenmark hinsichtlich der CD19-Expression von Plasmazellen</i> .....	79
3.2.4	<i>Vakzinierungs-Studien zur Untersuchung der CD19-Expression auf Plasmablasten</i> ....	82
3.2.5	<i>BZR-Stimulation von KM PZ</i> .....	85
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>98</b>
4.1	ZUSAMMENFASSUNG DER FRAGESTELLUNG UND BISHERIGEN ERGEBNISSE .....	98
4.2	DAS KNOCHENMARK ALS HAUPTSPEICHERORT CD19 <sup>(-)</sup> PZ .....	99
4.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON CD19 <sup>+</sup> UND CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ .....	100
4.3.1	<i>Identifizierung signifikant differenziell exprimierter Gene mittels Genexpressionsanalyse</i> .....	100
4.3.1.1	Technische Einschränkungen des verwendeten Systems .....	100
4.3.1.2	Genexpressionsanalyse liefert Hinweise auf Unterschiede in Differenzierung, Apoptose, Migration und Adhäsion sowie Immunantwort .....	102
4.3.2	<i>Durchflusszytometrische Charakterisierung des Phänotyps von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ</i> .....	104
4.3.2.1	Sowohl CD19 <sup>(-)</sup> als auch CD19 <sup>+</sup> KM PZ stellen reife PZ-Populationen dar .....	104
4.3.2.2	Expression von Ko-Rezeptoren des BZR-Signalwegs auf CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ .....	106
4.3.2.3	Expression von Molekülen mit Beteiligung an Adhäsion und Migration .....	107
4.3.2.4	Expression von Überlebensfaktoren .....	111

4.3.3	<i>Einfluss von microRNAs auf Unterschiede zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ</i>	112
4.3.4	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse aus Genexpressionsanalyse und Durchflusszytometrie</i>	113
4.3.5	<i>Mögliche Szenarien für die Entstehung von CD19<sup>(-)</sup> KM</i>	114
4.4	<b>FUNKTIONELLE STUDIEN ZU CD19<sup>+</sup> UND CD19<sup>(-)</sup> KM PZ</b>	115
4.4.1	<i>Vergleich der Überlebensfähigkeit von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ in vitro</i>	115
4.4.2	<i>Sowohl CD19<sup>+</sup> als auch CD19<sup>(-)</sup> KM PZ weisen Antigenspezifitäten gegen Tetanus, Mumps und Masern auf</i>	116
4.4.3	<i>Unterschiedliche Vorkommen von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> PZ im KM von Säuglingen und Erwachsenen</i>	119
4.4.4	<i>Nach primärer und sekundärer Immunantwort im Blut detektierbare PB und PZ exprimieren CD19</i>	120
4.4.5	<i>Stimulation von BZR und CD19 aktiviert BZR-Signalweg in CD19<sup>+</sup> KM PZ</i>	122
4.5	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK</b>	124
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	127
	<b>ANHANG</b>	145
	<i>LISTE ALLER SIGNIFIKANT DIFFERENZIELL EXPRIMIERTEN GENE IN CD19<sup>(-)</sup> VERSUS CD19<sup>+</sup> KM PZ</i>	145
	<i>EXPRESSION VON GENEN BESTIMMTER FUNKTIONELLER GRUPPEN</i>	163
	<i>B-Zell- und Plasmazell-Marker und Sortkontrolle</i>	164
	<i>Interleukine und Interleukin-Rezeptoren</i>	165
	<i>Chemokine und Chemokin-Rezeptoren</i>	167
	<i>Weitere Zytokine und ihre Rezeptoren</i>	169
	<i>Pro-apoptotische Moleküle</i>	171
	<i>Anti-apoptotische Moleküle</i>	172
	<i>Adhäsionsmoleküle</i>	173
	<b>PUBLIKATIONEN</b>	175
	<b>DANKSAGUNG</b>	176
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	177

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Abb	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
APC	Allophycocyanin
APRIL	<i>a proliferation inducing ligand</i>
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ASZ	Antikörper-sezernierende Zelle
Bach2	<i>BTB and CNC homology 1, basic leucine-zipper transcription factor 2</i>
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
Bcl	<i>B cell lymphoma</i>
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BCRT	Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien
BD	Becton, Dickinson and Company
BLNK	<i>B cell linker</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
BZR	B-Zell-Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
CIITA	<i>Class II transactivator</i>
CCL/R	<i>C-C motif ligand/receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CDR	<i>complementary-determining regions</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CXCL/R	<i>C-X-C motif ligand/receptor</i>
DAG	Diacylglycerol
Dapi	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DMF	Dimethylformamid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
(ds)DNA	<i>(double stranded) desoxyribonucleic acid</i>
DSG2	Desmoglein 2
DST	Dystonin
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISpot	<i>enzyme-linked immunospot assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
ES	<i>enrichment score</i> (Anreicherungswert)
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated /assisted cell sorting</i>
FC	<i>fold change</i> (-fache Veränderung)
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FcγRIIb	IgG-Fc-Rezeptor IIB
FcεRI	IgE-Fc-Rezeptor I
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FDR	<i>false discovery rate</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
FO	follikulär
FSC (-A, -H)	<i>forward scatter (-area, -height)</i> (Vorwärtsstreulicht (Peakfläche, -höhe))
g	Gramm
GCOS	<i>GeneChip Operating Software</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSEA	<i>gene set enrichment analysis</i>
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HLA (-DR, -ABC)	<i>human leukocyte antigen (-DR, -ABC)</i>
HPCDA	<i>High Performance Chip Data Analysis</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ID	Identifikator
IFN	Interferon
Ig (-A, -G, -M, -D, -E)	Immunglobulin (A, G, M, D, E)
IL	Interleukin
ILC	<i>innate lymphoid cells</i>
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
Irf4	<i>Interferon-regulatory factor 4</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine inhibitory motif</i>
ITP	Immunthrombozytopenie
iz	intrazellulär
kDa	Kilodalton
KLF2	Krüppel-like Faktor 2
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
KM	Knochenmark
l	Liter
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6C	<i>lymphocyte antigen 6C</i>
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCAM	<i>Melanoma Cell Adhesion Molecule</i>

Mcl1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
miR / miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
MITF	<i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>
ml	Milliliter
mM	millimolar
MM	Multiples Myelom
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
MSigDB	<i>Molecular Signatures Database</i>
MTA3	<i>metastasis associated 1 family, member 3</i>
MZ	Marginalzone
n.s.	nicht signifikant
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NES	<i>normalized enrichment score</i> (normalisierter Anreicherungs Wert)
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor 'Kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NZB/W	<i>New Zealand Black/White F1 Hybrid</i>
OD	Optische Dichte
PacB / PacO	<i>Pacific Blue / Pacific Orange</i>
Pax5	<i>Paired Box Protein 5</i>
PB	Plasmablast(en)
PBMZ	mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin Chlorophyll
pH	potentia Hydrogenii (lat.)
PI3K	Phosphatidyl-3 Kinase
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PKP2	Plakophilin 2
PLCy2	Phospholipase C-γ2
PMCA	Plasmamembran Ca <sup>2+</sup> ATPase
PRDM1	<i>PR domain zinc finger protein 1</i>
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PZ	Plasmazelle(n)
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Reverse Transkription
SA	Streptavidin
S1P1 (S1PR1)	Sphingosin-1-Phosphat (Rezeptor)
sec	Sekunde
SHIP	<i>Src Homology 2-containing Inositol 5' Phosphatase</i>



SHP1	<i>Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase-1</i>
SLR	<i>signal log ratio</i>
SMAD	<i>Small Mothers Against Decapentaplegic</i>
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STIKO	Ständige Impfkommission
Syk	<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>
TD	<i>T-cell dependent</i> (T-Zell-abhängig)
TEP	Totalendoprothese
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TI	<i>T-cell independent</i> (T-Zell-unabhängig)
TJP1	<i>Tight Junction Protein 1</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TT	Tetanus Toxoid
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>unit(s)</i> (Einheit(en))
u. a.	unter anderem
UPR	<i>unfolded protein response</i>
v. a.	vor allem
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Protein 1</i>
vgl.	vergleiche
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i> (Integrin $\alpha 4\beta 1$ )
v/v	Volumen/Volumen
Xbp1	<i>X-box binding protein 1</i>
x g	-fache Erdbeschleunigung g
z. B.	zum Beispiel
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ m	Mikrometer

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers. ....	5
Abb. 2: Entstehung von Plasmazellen. ....	9
Abb. 3: Schematische Darstellung der genetischen Regulation der Plasmazelldifferenzierung.....	11
Abb. 4: Schematische Darstellung der Überlebensnische von Plasmazellen im Knochenmark .....	18
Abb. 5: Beeinflussung des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs durch Ko-Rezeptoren.....	21
Abb. 6: Prinzip der Durchflusszytometrie und schematische Darstellung durchflusszytometrischer Daten. ....	30
Abb. 7: Exemplarische Darstellung des Nachweises von PB/PZ in verschiedenen Geweben bei durchflusszytometrischen Analysen. ....	34
Abb. 8: Das menschliche Knochenmark (KM) ist der Hauptspeicherort von CD19 <sup>(-)</sup> PZ. ....	49
Abb. 9 (umseitig): Die prozentuale Verteilung und Anzahl von CD19 <sup>+</sup> KM PZ und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ korrelieren nicht mit dem Alter der Donoren. ....	52
Abb. 10: <i>Heatmap</i> einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse von CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ. .....	52
Abb. 11: Auswahl signifikant angereicherter Gengruppen in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ versus CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	57
Abb. 12: Vergleich der Größe und Granularität von CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ. ....	59
Abb. 13: Durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von PZ-Markern auf CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ. ....	60
Abb. 14: Durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von MHC-Molekülen auf CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ.....	61
Abb. 15: Durchflusszytometrische Analyse der Ki67-Expression auf PB und PZ. ....	62
Abb. 16: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Ko-Molekülen des CD19- Komplexes auf CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ. ....	64
Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Ko-Rezeptoren des B-Zell- Rezeptor-Signalwegs auf CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ. ....	65
Abb. 18: Durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von Migrationsmolekülen auf CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ.....	68
Abb. 19: Durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von Adhäsions- und Migrationsmolekülen auf CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ. ....	69
Abb. 20: Durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von Adhäsionsmolekülen auf CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ.....	70
Abb. 21: Durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von Molekülen mit Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ. ....	72
Abb. 22: CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ weisen ein ähnliches miRNA Expressionsprofil auf.....	74
Abb. 23: CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ weisen in Zellkultur ähnliche Überlebenskapazitäten auf. .....	76
Abb. 24: Sowohl CD19 <sup>+</sup> als auch CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ Populationen enthalten Antikörper- sezernierende Zellen, die spezifisch gegen Tetanus Toxoid, Mumps, Masern oder EBV sind. ....	78
Abb. 25: CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ sezernieren tendenziell mehr spezifische IgG-Antikörper gegen Tetanus Toxoid, Mumps oder Masern als CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	79

Abb. 26: KM PZ von Säuglingen exprimieren CD19.....	81
Abb. 27 (umseitig): Nach sekundärer Vakzinierung mit Tetanus Toxoid (TT) generierte PB exprimieren CD19. ....	85
Abb. 28: CD19 <sup>+</sup> KM PZ und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ exprimieren Moleküle, die am Signalweg des B- Zell-Rezeptors (BZR) beteiligt sind. ....	86
Abb. 29: B-Zell-Rezeptor-Stimulation führt zur Phosphorylierung intrazellulärer Signalmoleküle in CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ. ....	88
Abb. 30 (umseitig): Stimulation von CD19 verstärkt die Wirkung einer B-Zell-Rezeptor- Stimulation auf den Phosphorylierungsgrad von Syk und Btk, nicht jedoch PLCγ2 in CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	90
Abb. 31: Stimulation mit Anti-CD19- und/oder Anti-BCR-Antikörpern reduziert die Überlebenskapazität von KM-Zellen <i>in vitro</i> . ....	91
Abb. 32: Stimulation mit Anti-CD19- und/oder Anti-BCR-Antikörpern hat keinen Einfluss auf die Ki67-Expression von KM-Zellen. ....	93
Abb. 33: HLADR-Expression auf KM-Zellen bleibt nach Stimulation mit Anti-CD19- und/oder Anti-BCR-Antikörpern unverändert.....	94
Abb. 34: CD19-Expression auf KM-Zellen <i>in vitro</i> nach Stimulation mit Anti-CD19- und/oder Anti-BCR-Antikörper bleibt langfristig stabil. ....	95
Abb. 35: Untersuchung des Einflusses einer CD19-Stimulation auf die Ig-Sekretion von KMPZ. ....	96
Abb. 36: Schematische Darstellung der Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Phänotypisierung von CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ. ....	114
Abb. 37: Schematische Darstellung des Konzeptes zur Entwicklung von CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ und zur Rolle von CD19 <sup>+</sup> und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ für das humorale Gedächtnis. ....	126
Abb. 38: Untersuchung der Expression von Plasmazell-Markern und Markern weiterer Zelllinien in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ und CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	164
Abb. 39: Untersuchung der Expression von Interleukinen in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ und CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	165
Abb. 40: Untersuchung der Expression von Interleukin-Rezeptoren in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ und CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	166
Abb. 41: Untersuchung der Expression von Chemokinen in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ und CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	167
Abb. 42: Untersuchung der Expression von Chemokin-Rezeptoren in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ und CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	168
Abb. 43: Untersuchung der Expression von Zytokinen und ihrer Rezeptoren in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ und CD19 <sup>+</sup> KM PZ.....	169
Abb. 44: Fortsetzung der Abb. 43: Untersuchung der Expression von Zytokinen und ihrer Rezeptoren in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ und CD19 <sup>+</sup> KM PZ.....	170
Abb. 45 (umseitig): Untersuchung der Expression pro-apoptotischer Moleküle in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ und CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	172
Abb. 46: Untersuchung der Expression antiapoptotischer Moleküle in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ und CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	172
Abb. 47: Untersuchung der Expression von Adhäsionsmolekülen in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ und CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	173
Abb. 48: Fortsetzung der Abb. 47: Untersuchung der Expression von Adhäsionsmolekülen in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ und CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	174

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Geräte. ....	25
Tabelle 2: Übersicht der im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Labormaterialien. ....	26
Tabelle 3: Zusammensetzung und Hersteller von verwendeten Standardmedien und – puffern. ....	27
Tabelle 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper und Reagenzien für durchflusszytometrische Analysen. ....	32
Tabelle 5: Verwendete Materialien für Gesamt-IgG- bzw. Gesamt-IgA-ELISA. ....	37
Tabelle 6: Verwendete Materialien für ELISpot. ....	39
Tabelle 7: Für den ELISpot-Assay verwendete Antikörper und Antigene. ....	40
Tabelle 8: Verwendete Stimulations-Antikörper und –Konditionen für PhosphoFlow. ....	41
Tabelle 9: Auswahl einiger in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ versus CD19 <sup>+</sup> KM PZ signifikant differenziell exprimierten Gene. ....	54
Tabelle 10: Zusammenfassung signifikant differenziell exprimierter Gene in CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ versus CD19 <sup>+</sup> KM PZ in funktionellen Gruppen mittels DAVID Bioinformatics Resources ....	55
Tabelle 11: Übersicht über GSEA-Analysen von CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ versus CD19 <sup>+</sup> KM PZ. ....	58
Tabelle 12: Vergleich der Ergebnisse aus Durchflusszytometrie und Affymetrix- Genexpressionsanalyse für CD19 <sup>+</sup> KM PZ und CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ. ....	73
Tabelle 13: Liste aller signifikant differenziell exprimierten Gene in CD19 <sup>+</sup> versus CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ. ....	145

# 1 EINLEITUNG

Der menschliche Organismus ist permanent der Gefährdung durch schädliche Substanzen oder Keime ausgesetzt, die über die Atemwege, Schleimhäute, die Nahrung oder über Wunden in unseren Körper gelangen können. Ob diese Fremdstoffe eine Erkrankung auslösen, hängt zum einen von ihrer Pathogenität und zum anderen von der Abwehrfähigkeit unseres Immunsystems ab. Dieses System ist ein interaktives Netzwerk aus lymphoiden Organen, Zellen, humoralen Faktoren und Zytokinen, dessen Funktionsweise einer präzisen Regelung bedarf, um einerseits eine optimale Abwehr pathogener Stoffe zu gewährleisten, andererseits jedoch auch eine überschießende Immunaktivität zu verhindern, die zu Allergien und Autoimmunerkrankungen führen kann. Die folgenden Kapitel geben zunächst einen kurzen Überblick über den Aufbau des humanen Immunsystems mit besonderem Fokus auf der Differenzierung und Rolle von Plasmazellen als Mediatoren des humoralen Immungedächtnisses und beschreiben anschließend aktuelle Konzepte zur Entwicklung und Homöostase langlebiger Plasmazellen im Knochenmark.

## 1.1 Angeborenes Immunsystem

Neben mechanischen und physiologischen Barrieren des Körpers wie z. B. der Haut und Schleimhäute sowie Speichel oder Magensäure können die Abwehrmechanismen des menschlichen Organismus im Wesentlichen zwei Bereichen zugeordnet werden: dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Während das angeborene Immunsystem eine sehr schnelle Reaktion auf potenziell pathogene (Fremd-)Stoffe ermöglicht, hochkonserviert und auch in niederen Lebewesen nachweisbar ist, allerdings stets mit der gleichen Intensität abläuft und nicht anpassungsfähig ist, erfolgt die adaptive (auch erworbene oder spezifische) Immunantwort mit einer zeitlichen Verzögerung von einigen Tagen bis zu mehreren Wochen, zeichnet sich jedoch durch eine hohe Spezifität und den Erwerb eines Immungedächtnisses aus und ist eine besondere Eigenschaft höherer Vertebraten.

### 1.1.1 Zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems

Im Blutstrom zirkulierende Monozyten können die Blutbahn verlassen und im Gewebe zu Makrophagen heranreifen, welche in der Lage sind, durch Expression bestimmter Rezeptoren körpereigene von körperfremden Molekülen zu unterscheiden, sodass sie eingedrungene Erreger erkennen und mittels Phagozytose entfernen können. Diese Rezeptoren erkennen verschiedene bakterielle Komponenten, wie z. B. die Carbohydrate Mannose und Glucan, Lipopolysaccharid (LPS) oder Bestandteile der Zellwände Gram-negativer Bakterien. Sogenannte Toll-like Rezeptoren (TLRs) tragen zur Erkennung pathogener Komponenten bei (Lien und Ingalls, 2002). Zusätzlich ermöglicht die Expression von Fc-Rezeptoren, welche Immunglobulin (Ig) binden, und Komplement-Rezeptoren die Beseitigung von durch Antikörper neutralisierten Toxinen oder Mikroorganismen, welche durch Antikörper

und/oder Komplement opsonisiert wurden. Aktivierte Makrophagen können durch Sekretion von Zytokinen und Chemokinen weitere Abwehrzellen wie z. B. neutrophile Granulozyten anlocken. Neutrophile besitzen ebenfalls Fc- und Komplement-Rezeptoren und beteiligen sich durch Phagozytose opsonisierter Partikel an der raschen Beseitigung entsprechend markierter Stoffe (vgl. Murphy, 2011).

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) zerstören infizierte oder maligne Zellen. Diese werden zum einen durch Fc $\gamma$ -Rezeptoren erkannt, die IgG-opsonisierte Zellen binden, wodurch diese in einem Prozess der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität getötet werden. Zum anderen besitzen NK-Zellen Rezeptoren, die MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) der Klasse I binden. Wenn bei Kontakt einer NK-Zelle mit einer anderen Zelle das erforderliche inhibitorische Signal durch Bindung von MHC-I-Molekülen fehlt, erfolgt die Tötung der Zielzelle durch Perforin und Injektion von zytotoxischen Granzymen. MHC-I-Komplexe werden normalerweise von allen gesunden Zellen (außer kernlosen Erythrozyten) gebildet. Einige Virusinfektionen oder maligne Transformationen können jedoch bewirken, dass MHC-I nicht mehr auf der Oberfläche betroffener Zellen exprimiert wird. Solche anomalen Zellen sind folglich durch NK-Zellen angreifbar (vgl. Murphy, 2011). In den letzten Jahren wurden neben NK-Zellen weitere lymphoide Zelllinien identifiziert, die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden können. Zusammen mit NK-Zellen werden diese Zellen als ILCs (*innate lymphoid cells*) bezeichnet und in zwei Hauptgruppen unterteilt: zytotoxische ILCs, also NK-Zellen, und Zytokin-produzierende „Helfer-ähnliche“ ILCs, wobei hier wiederum Untergruppen (ILC1-3) unterschieden werden. Die verschiedenen ILC-Linien haben eine unterschiedliche Verteilung in Geweben und ihre Entwicklung hängt von der Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren ab (detailliert beschrieben in Diefenbach et al., 2014).

Eine weitere zentrale Komponente des angeborenen Immunsystems sind dendritische Zellen (DZ). Diese phagozytotischen Zellen sind im Gewebe ansässig und können ebenso wie Makrophagen Mikroorganismen anhand von Rezeptoren erkennen, welche Pathogen-assoziierte Muster auf der Oberfläche körperfremder Organismen binden. Die Ligation dieser Rezeptoren mit einem Antigen führt zu Phagozytose und intrazellulärer Degradierung des gebundenen Moleküls, bevor die Bestandteile des Pathogens als kurze Peptide durch MHC-II-Moleküle auf der Oberfläche von DZ präsentiert werden. Auch die Freisetzung von Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) durch virusinfizierte Zellen oder ein Anstieg der Konzentration von Hitze-Schock-Proteinen kann eine Aktivierung von DZ bewirken. Aktivierte DZ migrieren zu lokalen Lymphknoten (LK), präsentieren dort zirkulierenden T-Zellen die durch MHC gebundenen Antigene und exprimieren die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche. Durch diese Eigenschaft gehören DZ zur Gruppe der Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) und sind für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems mitverantwortlich (vgl. Murphy, 2011).

Eosinophile Granulozyten sind hauptsächlich an der Abwehr von Parasiten beteiligt. Nach Aktivierung durch Zytokine und Chemokine exprimieren sie Rezeptoren für IgE (Fc $\epsilon$ RI) und besitzen zwei unterschiedliche Effektorfunktionen. Zum einen

sezernieren sie hochtoxische Granula-Proteine und freie Radikale, welche Mikroorganismen und Parasiten abtöten, allerdings auch Gewebeschäden bei allergischen Reaktionen verursachen können. Zum anderen induziert die Aktivierung von Eosinophilen die Synthese chemischer Mediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene und Zytokine, welche die inflammatorische Immunreaktion durch Aktivierung von Epithelzellen und Rekrutierung weiterer eosinophiler Granulozyten und Leukozyten verstärken (vgl. Murphy, 2011).

Basophile Granulozyten und Mastzellen exprimieren kontinuierlich hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI) und spielen eine wichtige Rolle bei Allergien. Quervernetzung der FcεRI durch Bindung von IgE an Allergene bewirkt die Degranulation und Freisetzung inflammatorischer Mediatoren, darunter Histamin, Serotonin, Prostaglandine und Leukotriene. Dies führt zu einer verstärkten vaskulären Permeabilität, Bronchokonstriktion und Inflammation (detailliert beschrieben in Murphy, 2011).

### **1.1.2 Humorale Bestandteile des angeborenen Immunsystems**

Zu den humoralen Faktoren des angeborenen Immunsystems gehören Zytokine, Akute-Phase-Proteine sowie das Komplementsystem. Zytokine wirken als Botenstoffe und bilden ein ganzheitliches Netzwerk zur Regulation von Immunantworten (Mire-Sluis et al., 1998). Ihre Wirkungsweise kann sowohl autokrin, parakrin als auch endokrin erfolgen und je nach Zytokin und Zielzelle u. a. Aktivierung, Zellteilung, Apoptose oder Migration hervorrufen. Zytokine, die von Leukozyten sezerniert werden und auf andere weiße Blutkörperchen einwirken, werden als Interleukine (IL) bezeichnet. Zytokine mit einer chemotaktischen Funktion gehören zur Gruppe der Chemokine (CC oder CXC). Interferone bilden ebenfalls eine eigene Untergruppe der Zytokine. Typ 1 Interferone (IFN-α und IFN-β) haben einen starken antiviralen Effekt, indem sie nicht-infizierte Zellen durch Hochregulation von MHC-I-Komplexen und Induktion intrazellulärer, antiviraler Moleküle schützen. Zudem wirken Typ 1 Interferone antiproliferativ. Typ 2 Interferon (IFN-γ) aktiviert Makrophagen und neutrophile Granulozyten, stimuliert die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und verstärkt die Antigen-Präsentation durch vermehrte Expression von MHC-II-Molekülen auf APZ (vgl. Murphy, 2011).

Im Rahmen einer unspezifischen Immunreaktion werden auch sogenannte Akute-Phase-Proteine gebildet, die von Hepatozyten in der Leber sezerniert und in die Blutbahn entlassen werden. Die Induktion von Akute-Phase-Proteinen erfolgt durch Botenstoffe wie TNF-α, IL1 und IL6. Zu den Akute-Phase-Proteinen gehören neben Proteinase-Inhibitoren und Koagulationsmediatoren u. a. das C-reaktive Protein und Mannose-bindendes Lektin (MBL), welche sich an der Opsonisierung von Pathogenen beteiligen und das Komplementsystem aktivieren können (vgl. Murphy, 2011).

Das Komplementsystem hat verschiedene Funktionen in der angeborenen Immunabwehr und besteht aus mehreren Glykoproteinen, die in einer

amplifizierenden Kaskade aktiviert werden. Diese Aktivierung kann auf drei verschiedenen Wegen stattfinden: Der klassische Weg erfolgt durch direkte Bindung des Komplement-Proteins C1q an Oberflächen von Pathogenen oder durch Bindung von C1q an Antigen-Antikörper-Komplexe. Der Mannose-bindende Lektin-Signalweg wird durch Bindung von MBL an Mannose-haltige Carbohydrate auf Bakterien oder Viren aktiviert. Der alternative Weg wird durch Bindung von spontan aktiviertem C3-Komplement an Oberflächen von Pathogenen induziert. Alle drei Wege resultieren in der Bildung einer Reihe immunologisch wirksamer Substanzen durch Spaltung inaktiver Vorstufen in aktive Fragmente. So beteiligt sich das Komplement-Fragment C3b an der Opsonisierung von Pathogenen und der Beseitigung von Immunkomplexen, während C3a und C5a als inflammatorische Mediatoren wirken. Die Komplement-Komponenten C5b, C6, C7, C8 und C9 bilden wiederum einen sogenannten *membrane-attack complex*, welcher zur Perforation der Zellmembran von Pathogenen und Zielzellen und somit zu deren Zelltod führt (vgl. Murphy, 2011).

## 1.2 Adaptives Immunsystem

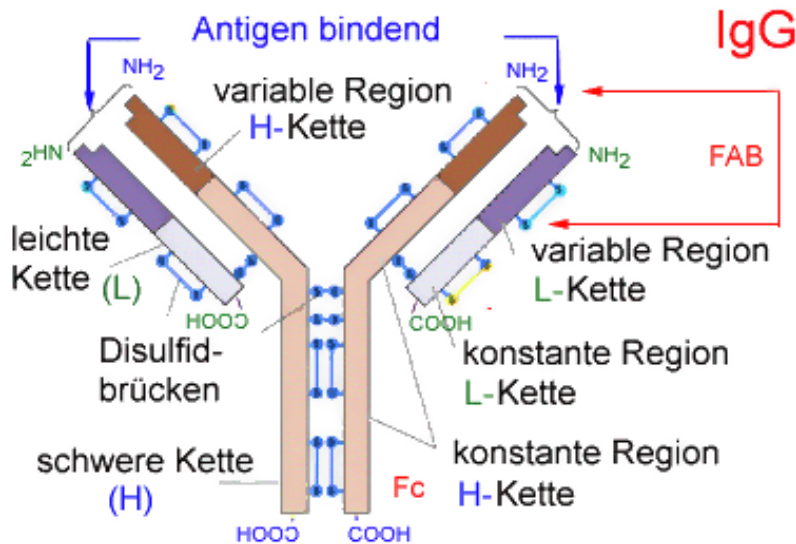
### 1.2.1 Bildung antigenspezifischer Rezeptoren auf B- und T-Zellen

Ein charakteristisches Merkmal des adaptiven Immunsystems ist die Generierung hochspezifischer Rezeptoren auf Lymphozyten, den sogenannten B-Zellen und T-Zellen, welche Epitope von Antigenen selektiv erkennen können und als Folge in hochspezialisierte Effektorzellen differenzieren. Beide Zelllinien entstehen im Knochenmark (Becken, Brustbein, Schädelknochen) aus Vorläuferzellen. Während B-Zellen bis zu ihrer Reife im Knochenmark verbleiben, migrieren Vorläufer von T-Zellen in den Thymus, wo sie die weiteren Entwicklungsstufen durchlaufen (Kruisbeek, 1999). Schon früh in der Entstehung beider Zelllinien werden antigenspezifische Rezeptoren durch Prozesse gebildet, die eine enorme Diversität der Rezeptoren ermöglichen (siehe unten). So entsteht ein Repertoire von theoretisch über  $10^{18}$  verschiedenen T-Zell-Rezeptoren und mehr als  $5 \times 10^{13}$  Antikörper-Spezifitäten (vgl. Murphy, 2011), genug, um das Spektrum an Pathogenen, denen der Körper im Laufe seines Lebens begegnen kann, abzudecken.

Antikörper, die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors, bestehen aus je zwei identischen schweren (50 kDa) und leichten (25 kDa) Polypeptid-Ketten, die durch Disulfid-Brücken zusammengehalten werden und zusammen eine Y-förmige Struktur bilden (Edelman, 1973) (Abb. 1). Jede Kette besitzt an ihrem N-Terminus eine variable Domäne, in der durch drei hypervariable CDR-Abschnitte (*complementary-determining regions*) eine Antigenbindung erfolgen kann. Der C-Terminus bildet die konstante Region. Welchem Isotyp das Immunglobulin zugehörig ist, entscheidet die konstante Region der schweren Ketten. Hierbei werden fünf Ig-Klassen unterschieden: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE, wobei IgG nochmals in vier Untergruppen, IgA in zwei Untergruppen unterteilt wird. Die verschiedenen Antikörper-Klassen haben unterschiedliche Funktionen und überwiegen in unterschiedlichen



Körperregionen: IgM kommt hauptsächlich intravaskulär vor, während IgA die dominierende Ig-Klasse in Sekreten darstellt. IgG bildet den größten Antikörper-Anteil in Blut und Gewebe. Sekretorisches IgA wird in Dimeren, zirkulierendes IgM in Pentameren durch Polypeptide, die sogenannten J-(joining)-Ketten, zusammengehalten (zusammengefasst in Delves und Roitt, 2000; Parkin und Cohen, 2001). Durch hydrophobe Transmembran-Sequenzen können Antikörper in der Zellmembran von B-Zellen verankert werden, wo sie als B-Zell-Rezeptor (BZR) wirken.



**Abb. 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers.** Je zwei schwere und leichte Ketten werden durch Disulfid-Brücken zu einer Y-förmigen Struktur stabilisiert. Die Antigenbindung erfolgt an den variablen Regionen des N-Terminus der schweren und leichten Ketten. Beide „Arme“ des Antikörpers, die sogenannten Fab-Fragmente, besitzen dabei dieselbe Antigen-Spezifität. Die Fc-Region am C-Terminus der schweren Ketten entscheidet über die Klasse des Immunglobulins. Entnommen aus: <http://www.biokurs.de/skripten/12/bs12-54.htm>

Die enorme Antikörper-Diversität wird durch mehrere Faktoren ermöglicht, welche durch Susumu Tonegawa erstmals entschlüsselt und beschrieben worden sind (Tonegawa, 1983). Die genetischen Komponenten für die Kodierung von Immunglobulinen liegen in Gruppen (Clustern) aus mehreren Gensegmenten vor. Die schwere Kette wird durch das *IGH* Cluster kodiert, während die Gene für die leichte Kette im *IGK* (für *kappa*) oder *IGL* (für *lambda*) Cluster liegen. Jedes dieser Cluster kann in verschiedene Gensegmente unterteilt werden: V (*variable*), D (*diversity*, nur im *IGH* cluster vorhanden), J (*joining*), und C (*constant*), wobei die V-, D- und J-Segmente wiederum aus mehreren Einzelgenen bestehen. Durch somatische Rekombination dieser Einzelgene, der sogenannten V(D)J-Rekombination, wird die Grundlage für die variablen Domänen eines BZR bzw. Antikörpers vor Antigeneinfluss geschaffen. Diese kombinatorische Vielfalt wird durch mehrere Mechanismen ergänzt, die bei der Verknüpfung der Gensegmente eine zusätzliche Erhöhung der Diversität bewirken. Hierzu gehören das Einfügen zusätzlicher neuer Nukleotide sowie die variable Deletion von Nukleotiden an den Schnittstellen der Einzelgene, die Kombination der schweren Kette mit zwei möglichen leichten Ketten (*kappa* oder *lambda*) sowie somatische Hypermutation (Livak und Petrie, 2001).

Die Gene des T-Zell-Rezeptors (TZR) sind ähnlich organisiert und besitzen ebenfalls V-, (D-), J- und C-Segmente. Die vier Lozi für die Ketten eines TZR werden als *TCRA*, *TCRB*, *TCRD* und *TCRG* bezeichnet und kodieren entsprechend sogenannte  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - oder  $\delta$ -Ketten, wobei der TZR entweder aus einem Heterodimer der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette oder (in selteneren Fällen) einem Heterodimer der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette zusammengesetzt sein kann. Wie bei den Genen der Immunglobuline sind die V-, D- und J-Segmente zusätzlich in Einzelgene unterteilt, welche wiederum durch V(D)J-Rekombination eine hohe Diversität der variablen Region der TZR-Ketten gewährleisten. Anders als BZR können TZR jedoch nicht durch somatische Hypermutation verändert werden (zusammengefasst in Delves und Roitt, 2000).

### 1.2.2 Entwicklung von B- und T-Zellen

Nach der Bildung von BZR und TZR können B- und T-Zellen Antigene binden und eine Immunantwort auslösen. Damit keine Aktivierung in Reaktion auf körpereigene Stoffe stattfindet, werden potenziell autoreaktive Lymphozyten ausgesondert. Dies geschieht durch spezielle Kontrollmechanismen während der Lymphozytenreifung. Im Thymus werden hierzu  $\alpha/\beta$  T-Zellen Antigene auf MHC-Molekülen präsentiert. Erkennen T-Zellen die körpereigenen MHC-Moleküle, findet eine positive Selektion statt. Reagieren diese T-Zellen jedoch auf körpereigene Antigene, erfolgt eine negative Selektion, die in der Apoptose der autoreaktiven T-Zellen mündet (Anderson et al., 1996; Fink und Bevan, 1995; Kruisbeek und Amsen, 1996). Erst nach diesen Selektionsprozessen werden diejenigen T-Zellen in die Peripherie entlassen, welche tolerant gegenüber körpereigenen Stoffen sind, jedoch fremde Antigene erkennen können, die über MHC-Komplexe präsentiert werden. Dabei wird zwischen zwei Hauptgruppen von T-Zellen unterschieden:  $CD8^+$  T-Zellen werden durch Kontakt mit viralen oder anderen intrazellulären Antigenen auf MHC-I-Molekülen aktiviert und besitzen eine zytotoxische Effektorfunktion, während  $CD4^+$  T-Zellen Antigene auf MHC-II-Komplexen erkennen, die ihnen von APZ präsentiert werden.  $CD4^+$  T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Steuerung bzw. Ausrichtung einer Immunantwort durch Sekretion von Zytokinen und/oder Aktivierung von B-Zellen (1.2.3) (zusammengefasst in Zielinski et al., 2011).

Ebenso wie T-Zellen entstehen B-Zellen im Knochenmark (bzw. während der Fetalperiode auch in der Leber) aus pluripotenten Stammzellen, verbleiben jedoch über mehrere Entwicklungsstufen hinweg in diesem Organ. Der Name der B-Zellen leitet sich von *Bursa fabricii* ab, einem lymphatischen Organ bei Vögeln, in welchem diese Lymphozytenlinie zuerst beschrieben wurde (zusammengefasst in Ribatti et al., 2006). In engem Kontakt zu Stromazellen des Knochenmarks differenzieren B-Zellen über ein Pro-B- und Prä-B-Zell-Stadium zu unreifen B-Zellen, welche IgM als BZR auf ihrer Oberfläche exprimieren. In diesen frühen Entwicklungsstufen findet bereits die somatische Rekombination und Bildung von funktionellen, antigenspezifischen, membrangebundenen Immunglobulinen statt (1.2.1), wobei jede B-Zelle genau eine molekular festgelegte Art eines BZR exprimiert und dadurch eine bestimmte Spezifität aufweist. Um Autoreaktivität zu verhindern, finden auch hier

Selektionsprozesse statt. B-Zellen, deren BZR mit hoher Affinität an körpereigenes Antigen bindet, können ihren Rezeptor durch erneute Rekombination der leichten Kette modifizieren (sogenanntes *receptor editing*). Wenn das Rekombinationsprodukt keine Autoreaktivität mehr aufweist, erfolgt eine normale Weiterentwicklung der betreffenden Zelle, anderenfalls wird der programmierte Zelltod eingeleitet (klonale Deletion) (Rajewsky, 1996).

B-Zellen mit einem funktionellen IgM-Rezeptor verlassen als naive, also Antigen-unerfahrene Lymphozyten das Knochenmark und zirkulieren im Blut und in sekundären lymphatischen Organen, wobei sie sich über transiente Zwischenstufen (T1 und T2) zu reifen, naiven B-Zellen weiter entwickeln, die auf ihrer Oberfläche sowohl IgM als auch IgD exprimieren. Durch Kontakt mit Antigenen können sie nun aktiviert werden, selbst Antigene über MHC-II-Komplexe präsentieren und zu Effektorzellen differenzieren (1.2.3). Solche IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> naiven B-Zellen werden auch als follikuläre (FO) B-Zellen bezeichnet. Man unterscheidet sie von Marginalzonen (MZ) B-Zellen, die nicht zirkulieren, sondern in der Marginalzone der Milz siedeln (zusammengefasst in Fairfax et al., 2008; Won und Kearney, 2002). MZ B-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der raschen T-Zell-unabhängigen Immunantwort zur Bekämpfung von Bakterien (1.2.3).

### **1.2.3 T-Zell-abhängige und T-Zell-unabhängige Immunantwort von follikulären B-Zellen**

Der folgende Absatz basiert auf den Übersichtsartikeln von Fairfax et al. (2008), Shapiro-Shelef und Calame (2005) sowie Shlomchik und Weisel (2012).

Antigene, die zur Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen führen, werden allgemein in zwei Kategorien unterteilt: T-Zell-abhängige (TD) und T-Zell-unabhängige (TI) Antigene. TD-Antigene enthalten Proteinkomponenten und werden von IgM-Rezeptoren auf der Oberfläche naiver FO B-Zellen erkannt, internalisiert und proteolytisch gespalten, um anschließend als Peptid-Fragmente über MHC-II-Moleküle wieder auf der B-Zell-Oberfläche präsentiert zu werden. Erreicht eine solche Antigen-präsentierende B-Zelle die T-Zell-Zone lymphatischer Organe, kann durch Interaktion der B-Zelle mit einer CD4<sup>+</sup> T-Zelle, welche dasselbe Antigen erkennt, ein direkter Zell-Zell-Kontakt hergestellt werden. Die T-Zelle produziert nun Zytokine, welche die B-Zelle aktivieren und zur Zellteilung anregen. Hierfür sind auch kostimulatorische Signale, v. a. die Bindung von CD40 auf B-Zellen mit CD40L auf T-Zellen, nötig.

Aktivierte B- und T-Zellen bilden zusammen in der T-Zell-Zone zunächst einen primären Fokus, in dem die Proliferation der B-Zellen stattfindet. Ein Teil der hieraus entstehenden antigenspezifischen B-Zellen differenziert anschließend in sogenannten extrafollikulären Foci zu kurzlebigen Plasmazellen, die IgM-Antikörper produzieren, welche dieselbe Antigenaffinität aufweisen wie die ursprünglich aktivierte B-Zelle.

Eine Affinitätsreifung antigenspezifischer B-Zellen findet hauptsächlich in Keimzentren sekundärer lymphatischer Organe statt. Diese liegen in B-Zell-Follikeln an der Grenze zur T-Zell-Zone. Hierher wandern B-Zellen nach ihrer Entstehung in primären Foci zusammen mit  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen, welche durch Sekretion von Zytokinen die Differenzierung der B-Zellen anregen. Die Antigenaffinität des BZR und somit qualitative oder quantitative Unterschiede in der Stärke des BZR-Signalwegs scheinen eine Rolle dabei zu spielen, welche Differenzierungswege eingeschlagen werden, da beobachtet werden konnte, dass eine niedrige Rezeptor-affinität hauptsächlich zur Bildung von Keimzentren führt, während eine hohe Affinität sowohl die Entstehung extrafollikulärer Foci als auch Keimzentren fördert (Paus et al., 2006; Tarlinton und Smith, 2000).

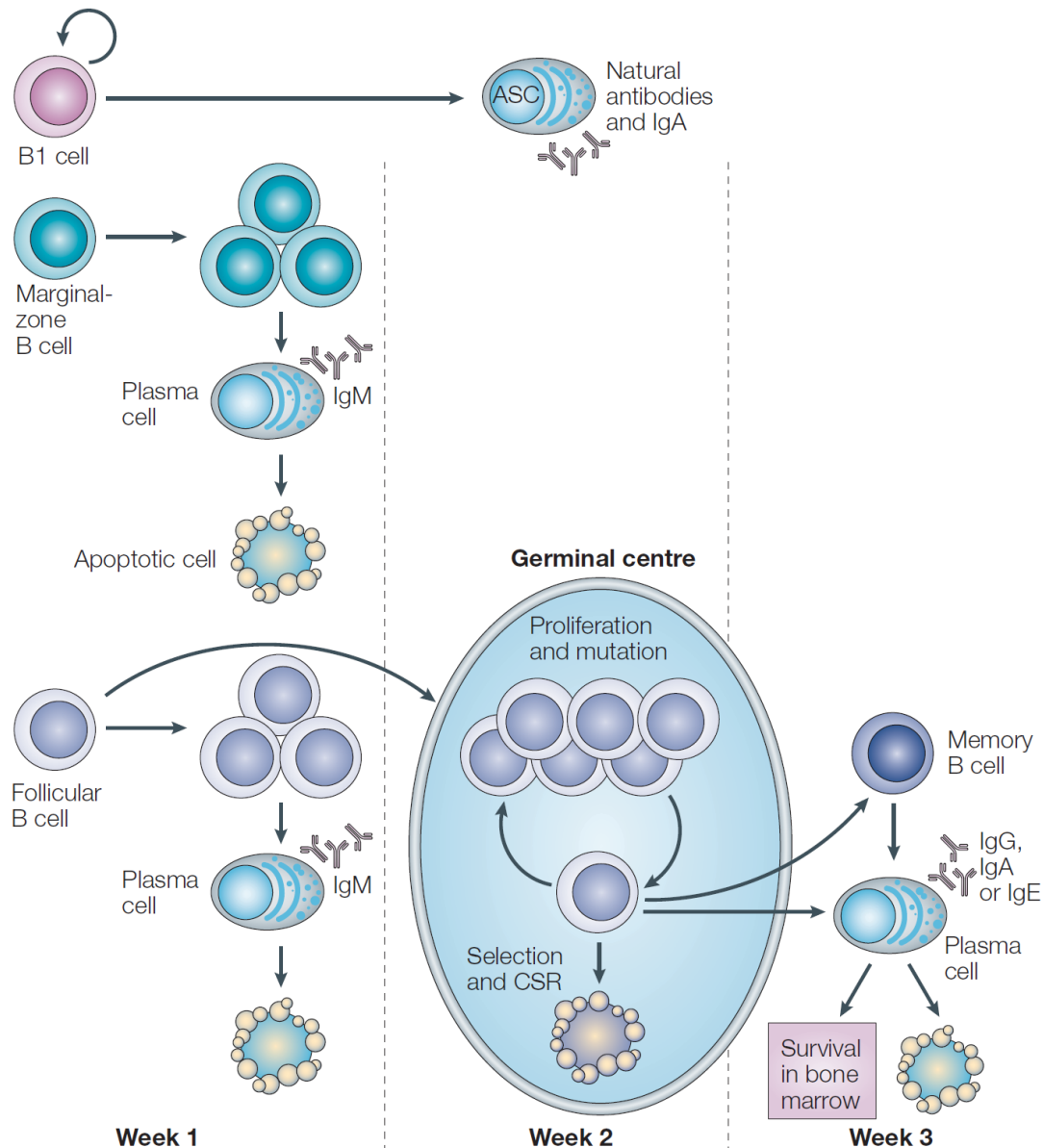
In der dunklen Zone der Keimzentren erfolgt zunächst eine starke klonale Expansion der B-Zellen, wobei ein Klassenwechsel der konstanten Region der schweren Kette vom IgM-Isotyp hin zu IgG, IgA oder IgE erfolgt und somatische Hypermutation in den Genen der variablen Regionen des BZR zu einer Veränderung der Affinität (Verstärkung oder Abschwächung) führen kann. In der hellen Zone der Keimzentren erfolgt nun eine Selektion durch follikuläre dendritische Zellen und  $CD4^+$  T-Zellen: Nur B-Zellen mit einer starken Rezeptoraffinität erhalten Überlebenssignale, während B-Zellen mit einer geringen Rezeptoraffinität in Apoptose gehen. Die positiv selektierten B-Zellen können nun zu Gedächtnis-B-Zellen oder zu Antikörper-sezernierenden Plasmablasten differenzieren (MacLennan, 1994; Rajewsky, 1996). Durch Migration in das Knochenmark und Ansiedelung in Überlebensnischen können sich Plasmablasten anschließend zu potenziell langlebigen Plasmazellen weiter entwickeln (siehe 1.3). Abb. 2 stellt einen schematischen Überblick über die verschiedenen Wege der Plasmazell-Reifung dar.

Plasmablasten und Plasmazellen bzw. die von ihnen produzierten Antikörper sind Vermittler der sogenannten humoralen Immunität: Durch Bindung zirkulierender Antikörper an Pathogene können diese neutralisiert oder für den Abbau durch Komponenten des angeborenen Immunsystems markiert werden.

Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen werden auch als Effektorzellen bezeichnet und bilden ein entscheidendes Merkmal des adaptiven Immunsystems: die Bildung eines humoralen Gedächtnisses durch die kontinuierliche Sekretion hochaffiner Antikörper durch langlebige Plasmazellen und die Entstehung eines reaktiven Gedächtnisses durch Gedächtnis-B-Zellen, die bei erneutem Antigenkontakt mittels Proliferation und Differenzierung zu Antikörper-sezernierenden Zellen eine schnelle und hochaffine Immunantwort einleiten können.

Durch welche Faktoren entschieden wird, ob B-Zellen während der Keimzentrumreaktion zu Gedächtnis-B-Zellen oder zu Plasmablasten differenzieren, ist noch nicht endgültig geklärt und Gegenstand aktueller Untersuchungen. Verschiedene Möglichkeiten sind hier denkbar: 1. extrinsische Signale durch andere Zellen, 2. affinitätsbasierte Signale durch den BZR, 3. zeitliche Unterschiede in der Verfügbarkeit von Signalen während der Keimzentrumreaktion, oder 4. stochastische Effekte. Unter Berücksichtigung der aktuellen Datenlage befürworten

Shlomchik et. al. die dritte Hypothese und schlagen ein Modell vor, bei dem in der frühen Phase der Keimzentrumsreaktion hauptsächlich Gedächtnis-B-Zellen gebildet werden, während zu späteren Zeitpunkten die Produktion von Plasmablasten überwiegt (Shlomchik und Weisel, 2012).



**Abb. 2: Entstehung von Plasmazellen.** Durch Kontakt mit Antigen können Marginalzonen-B-Zellen und follikuläre B-Zellen zu kurzlebigen IgM-sekernierenden Plasmazellen differenzieren. Mit Hilfe von T-Zellen können follikuläre B-Zellen zusätzlich Keimzentren bilden, in denen weitere Proliferation, Klassenwechsel (*class-switch recombination*, CSR) und Affinitätsreifung durch somatische Hypermutation erfolgen, bevor sie zu potenziell langlebigen Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen heranreifen (entnommen aus Shapiro-Shelef und Calame, 2005).

TI-Antigene können naive B-Zellen direkt, also ohne T-Zell-Hilfe, aktivieren und besitzen in der Regel hochrepetitive Komponenten (wie z. B. Polysaccharide oder Bestandteile von Bakterienzellwänden), welche eine Quervernetzung mehrerer BZR auf der Oberfläche von B-Zellen bewirken (Wortis, 1971). Da TI-Antigene keine Keimzentrumsreaktion hervorrufen, wurde angenommen, dass bei einer solchen B-Zell-Antwort keine Affinitätsreifung, kein Klassenwechsel und keine Bildung von

immunologischem Gedächtnis stattfinden und die entstehenden IgM-sezernierenden Plasmazellen kurzlebig sind. Neuere Untersuchungen hinterfragen dieses Konzept jedoch, da nach TI-Immunisierung auch die Initiierung von (vorzeitig terminierten) Keimzentrumsreaktionen (de Vinuesa et al., 2000) und die Bildung von Gedächtnis-B-Zellen beobachtet (Obukhanych und Nussenzweig, 2006) sowie langlebige Polysaccharid-spezifische Plasmazellen im Knochenmark detektiert werden konnten (Foote et al., 2012; Taillardet et al., 2009). Die gegenwärtige Studienlage lässt jedoch darauf schließen, dass die Entstehung Antikörper-produzierender Plasmazellen bei TI-Antworten auf extrafollikuläre Foci beschränkt bleibt (de Vinuesa et al., 1999; Foote et al., 2012; Hsu et al., 2006).

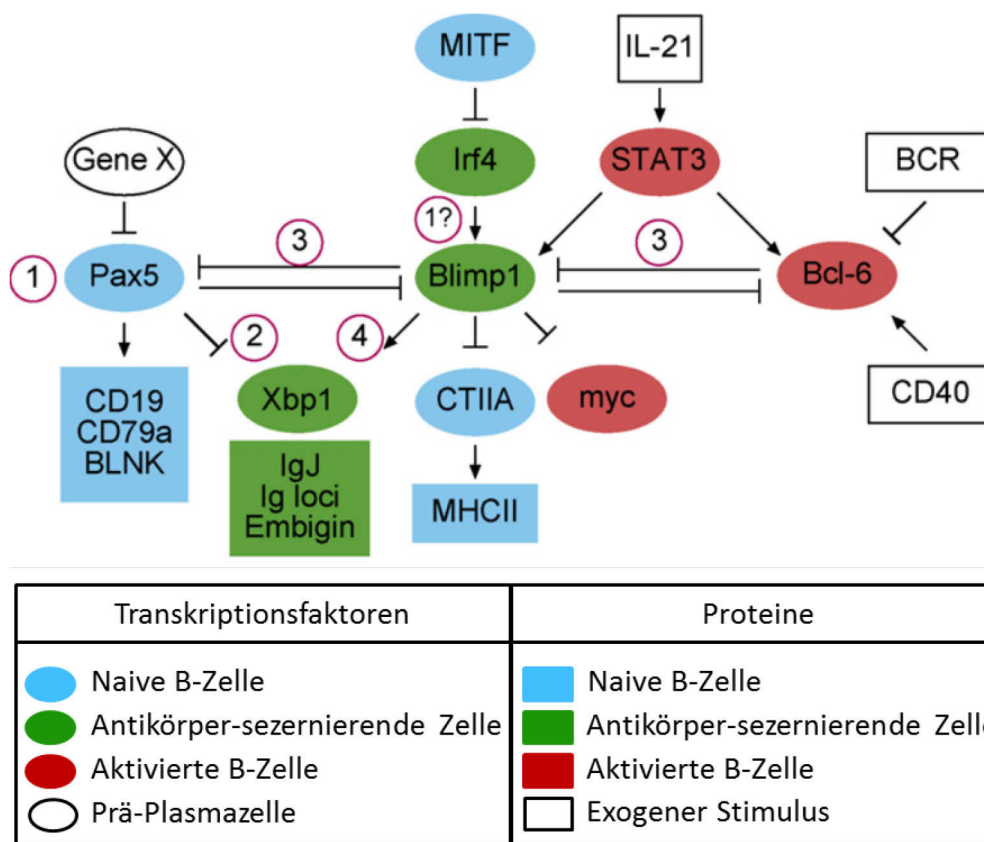
Eine Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen ist auch *in vitro* möglich. Bereits zu Beginn der 70er Jahre ging man davon aus, dass eine erfolgreiche Stimulation von B-Zellen zwei Signale erfordert: zum einen die Ligation des BZR und zum anderen ein kostimulatorisches Signal, das z. B. über von T-Zellen sezernierte Zytokine bereitgestellt werden kann (Cohn, 1971; Kishimoto et al., 1975). Auch *in vitro* Stimulation von B-Zellen über CD40 kann in Kombination mit Zytokinen Klassenwechsel und Bildung Antikörper-sezernierender Zellen bewirken (Hasbold et al., 2004; Tangye et al., 2003). Wichtige Zytokine sind hierbei v. a. IL-4 und IL-21 (Coffman et al., 1993; Ettinger et al., 2005; Ozaki et al., 2002 und 2004; Vinuesa et al., 2005).

#### **1.2.4 Regulation der Plasmazell-Reifung**

Die terminale Differenzierung von B-Zellen zu Plasmablasten und anschließend zu Plasmazellen ist gekennzeichnet durch die Umstellung von der Expression eines membrangebundenen Antikörpers, also des BZR, hin zur Sekretion löslicher Antikörper. Durch Synthese und Sekretion dieser hochspezifischen Moleküle sind Plasmazellen unerlässlich für eine effektive Immunantwort. Andererseits können sich Plasmazellen auch verschiedenen pathologischen Veränderungen, z. B. Autoimmunität oder multiples Myelom, unterziehen. Folglich muss die Aktivierung reifer B-Zellen, die Sekretion von Antikörpern und das Überleben der Plasmazellen genau kontrolliert werden. Dies geschieht u. a. mit Hilfe eines komplexen Systems von Transkriptionsfaktoren, die spezifisch in den verschiedenen B-Zell-Stadien exprimiert werden. (Abb. 3).

Pax5 (*paired box protein 5*) gilt als „Masterregulator“ der B-Zelllinie und ist entscheidend für die Entwicklung und Identität von B-Zellen (Busslinger, 2004; Cobaleda et al., 2007; Delogu et al., 2006; Nutt et al., 1999; Schebesta et al., 2002). Es ist verantwortlich für die Expression mehrerer Proteine, die für die B-Zell-Funktion von entscheidender Bedeutung sind, wie z. B. CD19, CD79a und BLNK (1.4.1) und reprimiert gleichzeitig die Expression von Xbp1, der J-Kette und des IgH- und IgL-Lokus (Linderson et al., 2004; Reimold et al., 1996; Rinkenberger et al., 1996; Roque et al., 1996), weshalb eine Differenzierung zu Plasmazellen die Repression von Pax5 voraussetzt. Zudem induziert Pax5 die Expression von Bach2 (*BTB and CNC homology 1, basic leucine-zipper transcription factor 2*) (Schebesta et al., 2007),

welches wiederum Blimp1 inhibiert und eine wichtige Funktion in der Abwicklung von Keimzentrumsreaktionen inne hat (Muto et al., 2004 und 2010). Ein weiterer inhibierender Faktor der Plasmazell-Entwicklung ist Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6*), ein transkriptioneller Repressor, der für die Bildung von Keimzentren benötigt und in hohem Maße von aktivierten B-Zellen in Keimzentren exprimiert wird (Cattoretti et al., 1995 und 2006; Dent et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Ye et al., 1997). Hier fördert Bcl-6 die Zellteilung und verhindert gemeinsam mit MTA3 (*metastasis-associated 1 family, member 3*) eine frühzeitige Differenzierung zu Plasmazellen durch Repression von Blimp1 (Fearon et al., 2002; Fujita et al., 2004; Reljic et al., 2000; Shaffer et al., 2000; Tunyaplin et al., 2004). Auch eine STAT3-abhängige Induktion von Blimp1 kann durch Bcl-6 inhibiert werden (Reljic et al., 2000).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der genetischen Regulation der Plasmazelldifferenzierung.** Die in B-Zellen exprimierten Transkriptionsfaktoren Pax5, Bcl-6 und MITF inhibieren die Entwicklung von Plasmazellen durch Repression von Blimp1, Xbp1 und Irf4. Eine Inhibition von Pax5 ermöglicht die Differenzierung zu Plasmazellen durch Expression von Xbp1 und Blimp1, welches wiederum eine reprimierende Wirkung auf Pax5 und Bcl-6 hat sowie die Expression von Xbp1 weiter verstärkt und somit Gene für Plasmazellfunktionen induziert. Entnommen aus und modifiziert nach Fairfax et al. (2008).

Blimp1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*) ist ein Schlüsselfaktor in der Plasmazell-Entwicklung (Shapiro-Shelef et al., 2003; Turner et al., 1994) und wird von Plasmablasten zunächst schwach, mit zunehmendem Reifegrad in Plasmazellen jedoch sehr stark exprimiert (Angelin-Duclos et al., 2000; Kallies et al., 2004). Die essentielle Rolle von Blimp1 zeigt sich in der Inhibition von c-myc, wodurch eine Arretierung des Zellzyklus bewirkt wird (Lin et al., 1997), in der Repression von B-Zell-Faktoren wie Bcl-6, Pax5, CIITA und CXCR5 (Lin et al., 2002; Shaffer et al.,

2002) sowie in einer Verstärkung der Xbp1-Expression (Shaffer et al., 2004). Dies ermöglicht die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und verhindert gleichzeitig, dass sich ausgereifte Plasmazellen zu einem früheren Stadium zurück entwickeln. Eine hohe Expressionsrate von Blimp1 ist essentiell für die Erhaltung langlebiger Plasmazellen im Knochenmark (Shapiro-Shelef et al., 2005). Irf4 (*Interferon-regulatory factor 4*) spielt eine Rolle in der erfolgreichen Abwicklung von Keimzentrumsreaktionen, wird aber auch schon früh während der Plasmazelldifferenzierung exprimiert (Klein et al., 2006; Sciammas et al., 2006). Dabei scheint die Wirkung von Irf4 dosisabhängig zu sein: Eine geringe Irf4-Konzentration fördert Keimzentrumsreaktionen, während eine hohe Konzentration von Irf4 die Plasmazelldifferenzierung auslöst. In B-Zellen wird die Expression von Irf4 durch MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) kontrolliert und auf einem geringen Niveau gehalten, weshalb MITF-defiziente Mäuse spontan Plasmazellen bilden können (Lin et al., 2004). Der transkriptionelle Aktivator Xbp1 (*X-box-binding protein 1*) gewährleistet die korrekte Bildung und Sekretion von Antikörpern und ist somit ebenfalls ein bedeutender Faktor für die Bildung und Erhaltung von Plasmazellen (Reimold et al., 2001; Shaffer et al., 2004).

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass die Rolle von Blimp1 vermutlich eher in der Erhaltung und Verstärkung des Differenzierungsprozesses als in ihrer Initiierung liegt, da in Blimp1-defizienten Mäusen eine initiale Plasmazelldifferenzierung mit verstärkter Expression von Xbp1 und Ig-mRNA beobachtet werden konnte (Kallies et al., 2007). In derselben Studie wurde zudem bemerkt, dass Pax5 bereits vor der Expression von Blimp1 herunterreguliert war. Somit wird angenommen, dass der entscheidende Schritt zur Initiierung der Plasmazelldifferenzierung die Inhibition von Pax5 darstellt und alle anderen Regulationen daraus folgen (Fairfax et al., 2008; Nera et al., 2006).

## **1.3 Das Knochenmark als Hauptspeicherort langlebiger Plasmazellen**

### **1.3.1 Konzepte zur Kontrolle des humoralen Gedächtnisses durch Plasmazellhomöostase**

Das humorale Gedächtnis entsteht durch langfristiges Überdauern spezifischer Antikörpertiter. Da die Halbwertszeit von Antikörpern nur wenige Tage (Vieira und Rajewsky, 1988), die Halbwertszeit von Antikörpertitern jedoch viele Jahre beträgt (Amanna et al., 2007), wurden verschiedene Konzepte entwickelt, um die Aufrechterhaltung des humoralen Gedächtnisses zu erklären (zusammengefasst in Radbruch et al., 2006): Zum einen könnte persistierendes Antigen zur kontinuierlichen Neubildung kurzlebiger Plasmazellen aus Gedächtnis-B-Zellen führen (Ochsenbein et al., 2000; Zinkernagel et al., 1996) oder die Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen, z. B. über Zytokin-Rezeptoren oder TLRs, in die Entstehung „langlebiger“ Plasmazellen mit einer bestimmten Halbwertszeit münden (Bernasconi et al., 2002; Traggiai et al., 2003). Zum anderen könnte humorales Immungedächtnis



auf dem langfristigen Überleben von Plasmazellen in hypothetischen Überlebensnischen beruhen, welche z. B. im Knochenmark lokalisiert sein könnten. Für letztere Hypothese sprechen folgende Gründe:

Bereits in den 1970er Jahren wurde festgestellt, dass bei Mäusen das KM der Hauptspeicherort Antikörper-sezernierender Zellen ist (Benner et al., 1977). Spätere Untersuchungen mit Mäusen ergaben, dass antigenspezifische Plasmazellen noch lange nach Abebben einer Immunantwort im Knochenmark detektierbar waren, während die Anzahl antigenspezifischer Plasmazellen in der Milz rasch abnahm. Zudem blieben spezifische Antikörpertiter weiterhin konstant hoch. Diese Beobachtungen waren nicht auf eine Persistenz des Antigens und damit fortwährende Neubildung von Plasmazellen zurückzuführen, da das verwendete Antigen nach einmaliger Immunreaktion vollständig aus dem Organismus eliminiert wurde (Slifka et al., 1995). Weitere Analysen bestätigten, dass im Maus-Knochenmark langlebige, nichtproliferierende Plasmazellen residieren (Manz et al., 1997; Slifka et al., 1998), deren Antikörpersekretion nicht auf die Anwesenheit von Antigenen angewiesen ist und deren Kompartiment nicht von einer Erneuerung durch Gedächtnis-B-Zellen abhängt (Ahuja et al., 2008; DiLillo et al., 2008; Manz et al., 1998). Auch in der murinen Milz konnten langlebige Plasmazellen detektiert werden (Kallies et al., 2004), jedoch stellt das Knochenmark nach derzeitigem Wissenstand den Hauptspeicherort langlebiger Plasmazellen dar, welche damit die wichtigste Quelle stabiler antigenspezifischer Antikörpertiter repräsentieren (Manz et al., 2005; Radbruch et al., 2006; Slifka und Ahmed, 1998).

Im humanen System konnte gezeigt werden, dass „die (therapeutische) Depletion von naiven B-Zellen und von Gedächtnis-B-Zellen durch den monoklonalen Anti-CD20-Antikörper Rituximab [...] nicht mit der Stabilität protektiver IgG-Antikörpertiter (Cambridge et al., 2003; Vallerskog et al., 2007) oder der Frequenz reifer CD138<sup>+</sup> Plasmazellen im Knochenmark [interferiert]“ (Mei, 2009b, S. 16f.). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch im Menschen langlebige Plasmazellen im Knochenmark residieren, welche „unabhängig von B-Zelldifferenzierung und Antigenexposition kontinuierlich und über lange Zeit Antikörper sezernieren und so das humorale Gedächtnis ausprägen“ (Mei, 2009b, S. 17).

### **1.3.2 Migration von Plasmablasten in das Knochenmark**

Für ihr Überleben sind Plasmazellen auf bestimmte Signale angewiesen, die eine Apoptose dieser Zellen verhindern (Cassese et al., 2003). Ohne diese Signale sterben Plasmazellen innerhalb weniger Tage, u. a. durch endoplasmatischen Stress, bedingt durch die massive Produktion von Antikörpern. Es wird vermutet, dass die erforderlichen Signale durch verschiedene Zelltypen im Knochenmark in sogenannten Überlebensnischen zur Verfügung gestellt werden (siehe 1.3.4. und 1.3.5). Für das Überleben von Plasmazellen ist es somit erforderlich, dass Plasmablasten, die Vorstufe reifer Plasmazellen, nach ihrer Generierung in das Knochenmark einwandern, um sich dort in diesen mikroanatomischen Nischen niederzulassen und zu langlebigen Plasmazellen zu differenzieren.

Plasmablasten, die aus reaktivierten Gedächtnis-B-Zellen oder im Rahmen einer T-Zell-abhängigen Immunantwort aus B-Zellen in Keimzentren differenzieren, regulieren die Chemokin-Rezeptoren CXCR5 und CCR7 herunter (Hargreaves et al., 2001) und weisen verstärkte Expression des Rezeptors für Sphingosin-1-Phosphat (S1P1) auf (Kabashima et al., 2006). Dies ermöglicht ihnen, die sekundären lymphatischen Organe zu verlassen. Plasmablasten besitzen im Gegensatz zu Plasmazellen noch migratorische Eigenschaften (Mei et al., 2009a; Odendahl et al., 2005), was möglicherweise auf der unterschiedlich starken Expression von Blimp1 beruht, da eine hohe Konzentration von Blimp1, wie in Knochenmark-Plasmazellen nachweisbar (1.2.4), in negativer Weise mit der Motilität der Zellen korreliert (Fooksman et al., 2010). Plasmablasten sezernieren bereits Antikörper, können jedoch durch ihre Fähigkeit zur Migration und Zellteilung sowie der immer noch starken Expression von MHC-II-Molekülen von reifen Plasmazellen abgegrenzt werden, die nicht mehr migrieren und proliferieren können und MHC-II-Moleküle nur noch schwach exprimieren (Mei et al., 2009a; Odendahl et al., 2005). Durch die Expression von CXCR4 können Plasmablasten entlang eines CXCL12-Gradienten in das Knochenmark einwandern (Hargreaves et al., 2001; Hauser et al., 2002; Peled et al., 1999), wo sie sich neben CXCL12-sezernierenden Stromazellen niederlassen. Die Rolle von CXCR4 wird in CXCR4-defizienten Mausmodellen deutlich, in denen die Akkumulation von Plasmazellen im Knochenmark stark vermindert ist (Cyster, 2003; Hargreaves et al., 2001).

Nach primären Immunantworten gegen Viren oder TD-Antigene reichern sich Plasmazellen nur langsam im Knochenmark an, während der Hauptanteil langlebiger Plasmazellen im Knochenmark aus sekundären Immunantworten und der damit verbundenen Reaktivierung von Gedächtnis-B-Zellen stammt, welche in der Bildung hoher Plasmazellzahlen resultiert (Benner et al., 1981; Kabashima et al., 2006; Manz et al., 1998; Slifka et al., 1995). Dass langlebige Plasmazellen im Knochenmark aus Keimzentrumsreaktionen stammen, kann darauf zurück geführt werden, dass sie hohe Mutationsfrequenzen aufweisen und hochaffine IgG- oder IgA-Antikörper sezernieren, was bedeutet, dass sie die typischen Merkmale einer Keimzentrumsreaktion, nämlich somatische Hypermutation, Klassenwechsel und Affinitätsreifung, durchlaufen haben (Smith et al., 1996).

Obwohl das Knochenmark den größten Anteil an ruhenden langlebigen Plasmazellen enthält, können Überlebenssignale auch von anderen Geweben exprimiert werden. So konnten langlebige Antikörper-sezernierende Zellen in sekundären lymphatischen Organen von NZB/W Mäusen (Hoyer et al., 2004) ebenso nachgewiesen werden wie in chronisch entzündlichem Gewebe dieser Tiere (Cassese et al., 2001; Lacotte et al., 2013; Starke et al., 2011). Die Migration von Plasmablasten in solche Organe wird vermutlich durch die Sekretion der CXCR3-Liganden CXCL9 und CXCL11 gesteuert, da Plasmablasten neben CXCR4 auch CXCR3 exprimieren und entlang eines Gradienten dieser Liganden migrieren können (Hauser et al., 2002; Janatpour et al., 2001; Odendahl et al., 2005). Durch die Möglichkeit der Einwanderung von Plasmablasten in entzündetes Gewebe und der dortigen Differenzierung in Plasmazellen wird eine erfolgreiche Immunantwort unterstützt, da eine maximale

Menge an spezifischen Antikörpern am Entzündungsherd zur Bekämpfung von Erregern produziert wird. Weil nach Ablauf einer erfolgreichen Immunantwort und Abklingen der Entzündung auch die Überlebensnischen der Plasmazellen in diesen Geweben aufgelöst werden, führt dies zur Apoptose der hier befindlichen Plasmazellen, da sie keine Überlebenssignale mehr erhalten und auch nicht mehr zu anderen Nischen, wie z. B. in das Knochenmark, wandern können. Somit wird die Immunantwort beendet und ein Überschießen der Reaktion verhindert.

### 1.3.3 Ansiedelung von Plasmazellen in Überlebensnischen

CXCL12 fördert die Transmigration von Plasmablasten durch das Knochenmark-Endothel (Peled et al., 1999) und deren Niederlassung neben Stromazellen (Abb. 4). Es wird vermutet, dass Stromazellen einen zentralen Bestandteil der Überlebensnischen für Plasmazellen bilden, indem sie direkte Kontakte mit Plasmazellen eingehen (Tokoyoda et al., 2004) und CXCL12 sezernieren, welches einen antiapoptotischen Effekt auf Plasmazellen ausübt (Cassese et al., 2003). Der positive Effekt von Stromazellen auf das Überleben von Plasmazellen konnte auch *in vitro* sowohl für murine als auch humane Zellen gezeigt werden (Hiepe, 2009; Minges Wols et al., 2002 und 2007). Zehentmeier et. al. gelang es zudem, durch Zwei-Photonen-Mikroskopie die Motilität von Plasmazellen im Knochenmark von Mäusen zu analysieren. Dabei stellten sie fest, dass der Großteil der Plasmazellen enge und stabile Verbindungen zu Stromazellen eingeht (Zehentmeier et al., 2014). Dies steht in deutlichem Kontrast zu B-Zellen im Knochenmark und kurzlebigen Plasmazellen in sekundären lymphatischen Organen, welche eine hohe Mobilität aufweisen (Fooksman et al., 2010). Neben CXCL12 sind Adhäsionsmoleküle für die Ansiedelung von Plasmablasten/Plasmazellen neben Stromazellen entscheidend. So können bestimmte Proteine der extrazellulären Matrix, wie Fibronektin und Hyaluronsäure, als Andockstellen für immigrierende Plasmablasten dienen (Cyster, 2003). Weitere Studien im Mausmodell zeigten zudem, dass CXCL12<sup>+</sup> Stromazellen im Knochenmark auch VCAM1 exprimieren, den Liganden für die auf Plasmazellen exprimierten Integrine  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) und  $\alpha 4\beta 7$ , und vermutlich auf diese Weise die Verankerung der Plasmablasten/Plasmazellen in der Überlebensnische ermöglichen (DiLillo et al., 2008). Eine Herunterregulation von  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin verhindert die zielgerichtete Migration und Ansiedelung von Plasmablasten in das Knochenmark, wie in Mäusen mit KLF2-defizienten B-Zellen beobachtet werden konnte (Winkelmann et al., 2011).

Etwa eine Woche nach sekundärer Vakzinierung eines Menschen können HLADR<sup>stark</sup> exprimierende, migratorische Plasmablasten im peripheren Blut detektiert werden (Medina et al., 2002; Odendahl et al., 2005). Andererseits steigt zur gleichen Zeit auch die Anzahl HLADR<sup>schwach</sup> exprimierender Plasmazellen verschiedener Antigenspezifitäten im Blut an. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass neu generierte Plasmablasten bei ihrer Immigration ins Knochenmark mit dort ansässigen Plasmazellen um die begrenzt vorhandenen Überlebensnischen konkurrieren und ruhende Plasmazellen kompetitiv verdrängen können (Odendahl et al., 2005;

Radbruch et al., 2006). Solche aus ihren Nischen herausgelöste Plasmazellen können im Gegensatz zu Plasmablasten nun nicht mehr zu anderen Nischen wandern und gehen letztendlich in Apoptose. Somit ist eine regelmäßige Anpassung des Organismus an neue immunologische Herausforderungen und eine Optimierung des humoralen Gedächtnisses gewährleistet. Auch die nachgewiesene konstante Rate an Plasmazellen von etwa 0,5-1% aller Zellen im Knochenmark (Terstappen et al., 1990) kann auf diese Weise erklärt werden.

#### **1.3.4 Überblick über bisher bekannte Signale, die das Überleben von Plasmazellen fördern**

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Faktoren identifiziert, die einen positiven Effekt auf das Überleben von Knochenmark-Plasmazellen ausüben. Neben der bereits erwähnten Ko-Kultivierung mit Stromazellen gehören hierzu die Zytokine IL5, IL6, TNF- $\alpha$ , CXCL12, BAFF und APRIL ebenso wie Fibronectin und Hyaluronsäure, die Liganden für auf Plasmazellen exprimiertes VLA-4 und CD44 (Avery et al., 2003; Belnoue et al., 2008; Benson et al., 2008; Cassese et al., 2003; Kawano et al., 1995; Roldan et al., 1992).

Durch Bindung von CD80/86 auf aktivierten DZ an CD28 auf Plasmazellen kann ein direktes Überlebenssignal gesendet werden, da die Stimulation von CD28 den antiapoptotischen NF $\kappa$ B-Signalweg aktiviert (Rozanski et al., 2011). Interessanterweise konnte dieser Effekt nur in Plasmazellen des Knochenmarks beobachtet werden, nicht jedoch in Plasmazellen aus der Milz, vermutlich weil dort der Schwellenwert für eine Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs wesentlich höher ist. Folglich führt die Ligation von CD28 nur im Knochenmark zu einer verstärkten NF $\kappa$ B-abhängigen Expression überlebensfördernder Faktoren. Die Vernetzung von CD80/86 mit CD28 bewirkt wiederum eine gesteigerte Produktion von IL6 in DZ des Knochenmarks. Somit scheint CD28 ein Faktor zu sein, mit dessen Hilfe Knochenmark-Plasmazellen ihre unmittelbare Umgebung selbst gestalten und regulieren können (Nair et al., 2011).

Des Weiteren ist die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle förderlich für das Überleben von Plasmazellen im Knochenmark. So konnte ein antiapoptotischer Effekt von CD93 auf Plasmazellen nachgewiesen werden (Chevrier et al., 2009). Zudem vermag CD138 auf Myelom-Zellen als Ko-Rezeptor für APRIL zu agieren und damit Überlebenssignale zu vermitteln (Moreaux et al., 2009). Da CD138 auch auf gesunden Plasmazellen im Knochenmark exprimiert wird, wäre hier ein vergleichbarer Mechanismus denkbar. Weil die genannten überlebensfördernden Faktoren jedoch zumeist *in vitro* identifiziert und analysiert wurden, sollten die daraus gewonnenen Erkenntnisse vorsichtig interpretiert werden, da sie die tatsächliche Situation *in vivo* ggf. nur inadäquat imitieren können.

Die bedeutende Rolle von APRIL und BAFF konnte hingegen auch *in vivo* gezeigt werden, da eine Neutralisation beider Zytokine zu einer Depletion antigenspezifischer Plasmazellen im Knochenmark führt, während die Verfügbarkeit eines dieser beiden Zytokine ausreicht, um die Plasmazell-Population im Knochenmark zu erhalten

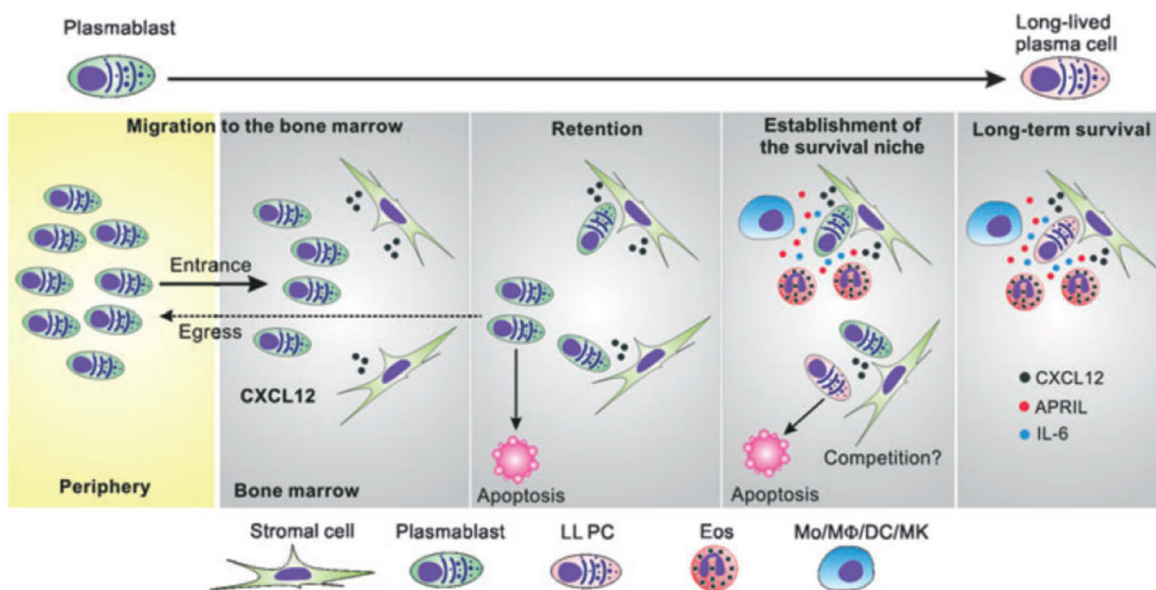
(Benson et al., 2008). Sowohl APRIL als auch BAFF binden an den Rezeptor BCMA und induzieren dadurch in Plasmazellen des Knochenmarks, nicht jedoch in der Milz, die Expression des antiapoptotischen Moleküls Mcl1, welcher essentiell für das Überleben von Plasmazellen ist (Peperzak et al., 2013). BCMA-Defizienz führt zu einer starken Beeinträchtigung der Plasmazell-Langlebigkeit (O'Connor et al., 2004). Da bei einer Übertragung von Plasmazellen in BAFF-defiziente Mäuse vergleichbare Plasmazellzahlen im Knochenmark detektiert werden konnten wie in Wildtyp-Mäusen (Belnoue et al., 2008), wird BAFF eine untergeordnete Rolle zugeordnet, während APRIL zurzeit als wichtigster Überlebensfaktor für Plasmazellen angesehen wird (Belnoue et al., 2012; Chu und Berek, 2012).

### **1.3.5 Zelluläre Komponenten der Überlebensnische von Plasmazellen**

Welche Zellen durch Sekretion der oben genannten Moleküle zum Erhalt der Plasmazellen im Knochenmark beitragen, wird kontrovers diskutiert und ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Neben Osteoklasten (Geffroy-Luseau et al., 2008) wird IL6-produzierenden Basophilen (Rodriguez Gomez et al., 2010), Ly6C<sup>++</sup> Monozyten (Belnoue et al., 2012) und APRIL-sezernierenden Neutrophilen (Huard et al., 2008) ein positiver Einfluss auf das Überleben von Plasmazellen zugeschrieben. Zudem wurde beschrieben, dass Eosinophile, Megakaryozyten und myeloide Zellen IL6 und APRIL sezernieren können, CXCR4 exprimieren und mit Plasmazellen im Knochenmark ko-lokalisieren (Chu et al., 2011; Matthes et al., 2011; Winter et al., 2010) (Abb. 4) und somit aller Wahrscheinlichkeit nach wichtige Komponenten der Überlebensnische darstellen. Die Hauptquelle überlebensfördernder Faktoren für Plasmazellen scheint folglich hämatopoietischen Ursprungs zu sein (zusammengefasst in Chu und Berek, 2012; Roth et al., 2014; Tangye, 2011; Tellier und Kallies, 2014).

Eine Aktivierung von Eosinophilen im Rahmen einer Immunantwort trägt zur Langlebigkeit der Plasmazellen im Knochenmark bei (Chu und Berek, 2012), während die Abwesenheit von Eosinophilen oder Megakaryozyten zu einer Minderung der Plasmazell-Population im Knochenmark führt (Chu et al., 2011; Winter et al., 2010). Diese Ergebnisse konnten in Eosinophil-defizienten  $\Delta$ dblGATA-1 Mäusen bestätigt werden. Hier vermochten Plasmablasten zwar in normaler Anzahl in das Knochenmark einzuwandern, die Ansiedelung und Reifung zu Plasmazellen war jedoch stark eingeschränkt (Chu und Berek, 2012; Yu et al., 2002). Dies verdeutlicht eine zentrale Rolle von Eosinophilen als Faktoren der Überlebensnische von Plasmazellen im Knochenmark, ebenso wie CXCL12<sup>+</sup> VCAM1<sup>+</sup> Stromazellen, deren Ausbildung von Zellkontakten zu Plasmazellen ebenfalls essentiell für die Erhaltung langlebiger Plasmazellen ist (Tokoyoda et al., 2010). Interessanterweise konnten Zehentmeier et. al. mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie nur eine geringe Anzahl an Kontakten zwischen Plasmazellen auf der einen und Eosinophilen oder Megakaryozyten auf der anderen Seite feststellen, während Verbindungen zu Stromazellen in hoher Zahl eingegangen wurden und eine große Stabilität aufwiesen (Zehentmeier et al., 2014).

Wie genau die Bildung und Erhaltung der Überlebensnischen für Plasmazellen reguliert wird, ist noch unklar und Gegenstand aktueller Forschungen. Im Gegensatz zu langlebigen Stromazellen haben Eosinophile nur eine kurze Lebensdauer. Um eine kontinuierliche Bereitstellung von Überlebensfaktoren sicherzustellen, müssen sterbende Eosinophile folglich durch neue ersetzt werden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Stromazellen, die Kontakte mit Plasmazellen ausbilden, nicht proliferieren und folglich eine stabile Komponente der Überlebensnische bilden, während Eosinophile eine hohe Proliferationsrate aufweisen. Nach Bestrahlung und damit verbundener Depletion kurzlebiger Zellen konnten neugebildete Eosinophile in der Umgebung von bestrahlungsresistenten Plasmazellen und Stromazellen ansiedeln. Somit stellen Eosinophile eine dynamische Komponente der Überlebensnische dar (Zehentmeier et al., 2014). Es ist denkbar, dass auch die Plasmazellen selbst zur Regulation ihrer Nische beitragen, indem sie Signale senden, mit denen bestimmte Zellen angelockt oder die Sekretionsrate von Überlebensfaktoren erhöht werden kann. Genauere Untersuchungen hierzu könnten in Zukunft zum besseren Verständnis der Entwicklung und Organisation von Plasmazell-Überlebensnischen im Knochenmark beitragen.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Überlebensnische von Plasmazellen im Knochenmark.** Plasmablasten migrieren entlang eines CXCL12-Gradienten in das Knochenmark, wo sie mit anderen Plasmablasten und ansässigen Plasmazellen um die Ansiedelung in Überlebensnischen konkurrieren. Durch Ko-Lokalisation mit Stromazellen werden Plasmablasten im Knochenmark gehalten und differenzieren zu langlebigen Plasmazellen (LL PC). Neben CXCL12-sezierenden Stromazellen tragen auch Eosinophile (Eos) und weitere Zellen wie Monozyten (Mo), Makrophagen (MΦ), dendritische Zellen (DC) und Megakaryozyten (MK) zur Langlebigkeit von Plasmazellen durch Sekretion überlebensfördernder Zytokine wie APRIL und IL6 bei. Entnommen aus Chu und Berek (2013).

## 1.4 Funktion von CD19 als Ko-Rezeptor des B-Zell-Rezeptor-Komplexes

### 1.4.1 Überblick über den B-Zell-Rezeptor-Signalweg

Die Aktivierung von B-Zellen wird durch Bindung von Antigen an den membran-gebundenen BZR initiiert. Dies führt zu einer Aggregation von BZR-Komplexen, welche aus den schweren und leichten Ketten der BZR-Moleküle und Igαβ-Heterodimeren (CD79a und CD79b) bestehen (Reth, 1989), und zur Phosphorylierung der intrazellulären ITAMs (*immunoreceptor tyrosine activation motifs*) von Igαβ durch Src-Kinasen, wie z. B. Lyn. Dadurch wird eine Rekrutierung und Phosphorylierung von Syk (*spleen tyrosine kinase*) bewirkt, was wiederum in die Bildung und Aktivierung eines sogenannten „Signalosoms“ mündet, bestehend aus verschiedenen Signalmolekülen (Abb. 5). Die Phosphorylierung des Adaptermoleküls BLNK (*B-cell linker*) in diesem Signalosom führt u. a. zur Rekrutierung von Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) und PLCγ2 (Phospholipase C-γ2) (Dal Porto et al., 2004; DeFranco, 1997; Fu et al., 1998; Goitsuka et al., 1998; Kurosaki, 1999; Kurosaki und Kurosaki, 1997; Reth und Wienands, 1997; Wienands et al., 1998). Btk bindet mit hoher Affinität an das Membranlipid Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> oder PIP<sub>3</sub>) (Salim et al., 1996) und trägt zur Aktivierung von PLCγ2 bei (Humphries et al., 2004). Die Funktion von Btk ist dabei von der Bindung zu PIP<sub>3</sub> abhängig (Rawlings et al., 1993). PLCγ2 wiederum spaltet das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) in die Signalmoleküle Inositol-1,4,5-Trisphosphat (InsP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG), was in einem Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration resultiert (zusammengefasst in Scharenberg et al., 2007). Letztendlich mündet der BZR-Signalweg u. a. in eine Aktivierung des NFAT- und des NFκB-Signalwegs und führt zu einer Reihe von zellulären Prozessen, wie z. B. Regulation der Genexpression und Umbau des Zytoskeletts.

Während die Mechanismen und Effekte des BZR-Signalwegs in B-Zellen gut untersucht sind, liegen zu Plasmazellen in dieser Hinsicht kaum Informationen vor. Dies mag zum Teil daran liegen, dass Plasmazellen als enddifferenzierte Zellen angesehen werden, deren biologische Rolle in der kontinuierlichen Sekretion der löslichen Variante des BZR in Form von Antikörpern zu sehen ist. Folglich beteiligen sich Plasmazellen bereits aktiv an der Bildung und Aufrechterhaltung des humoralen Gedächtnisses und bedürfen dazu keiner zusätzlichen „Aktivierung“ über den BZR, wie das bei naiven B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen der Fall ist. Vor kurzem zeigten Pinto et. al., dass IgA<sup>+</sup> und IgM<sup>+</sup> Plasmazellen einen funktionellen BZR auf ihrer Oberfläche exprimieren, indem sie aus humanem Knochenmark isolierte CD138<sup>+</sup> Plasmazellen und *in vitro* differenzierte Plasmazellen mit Anti-Ig-Antikörpern stimulierten und anschließend bei IgA<sup>+</sup> und IgM<sup>+</sup>, nicht jedoch bei IgG<sup>+</sup> Plasmazellen eine Phosphorylierung intrazellulärer Signalmoleküle wie Syk, ERK und Akt beobachten konnten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der BZR auch in Plasmazellen eine funktionelle Rolle spielen könnte und bieten eine Grundlage für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet.

### 1.4.2 CD19 als aktivierender Ko-Rezeptor

Die vielfältigen Auswirkungen der B-Zell-Aktivierung auf Ereignisse in der Immunantwort erfordern ein „Sicherheitsnetz“, das durch Regulation des BZR-Signalwegs ein Überschießen der B-Zell-Antwort ebenso verhindert wie eine fehlende Reaktion derselbigen. Untersuchungen von B-Zell-Antworten auf eine Stimulation mit Antigen haben ergeben, dass für die Aktivierung des BZR-Signalwegs ein bestimmter Schwellenwert überschritten werden muss, der von der Affinität des Antigens abhängt (Batista et al., 2001; Batista und Neuberger, 1998 und 2000). Dieser Schwellenwert kann durch Aktivierung von CD19, welches in einem Ko-Rezeptor-Komplex mit CD21 und CD81 vorliegt, herabgesenkt werden (Carter und Fearon, 1992; Tedder et al., 1994). CD19 wird ab dem Pro-B-Zell-Stadium auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert, durch Pax5 reguliert und gilt als klassischer Marker der B-Zelllinie (Kozmik et al., 1992; Nadler et al., 1984). In CD19-defizienten Mäusen ist die B-Zell-Antwort nach Antigen-Stimulation und die Bildung von Antikörpern stark beeinträchtigt, während in hCD19 Mäusen, welche ein Transgen für humanes CD19 überexprimieren, eine überschießende Reaktion der B-Zellen sowie Produktion von Autoantikörpern beobachtet werden kann (Engel et al., 1995; Rickert et al., 1995). Auch im humanen System sind die Auswirkungen einer CD19-Defizienz mit dem Phänotyp CD19-defizienter Mäuse vergleichbar (van Zelm et al., 2006). Folglich ist CD19 in der Regulation des BZR-Signalwegs und in der Kontrolle peripherer Toleranz involviert (Inaoki et al., 1997). Ein Ligand für CD19 konnte bisher nicht identifiziert werden. Durch den Zusammenschluss von CD19 mit CD21, dem Rezeptor für die Komplement-Faktoren C3d, iC3b und C3dg (Cherukuri et al., 2001), kann eine Aktivierung des BZR durch Komplement-gebundenes Antigen eine gleichzeitige Stimulation des BZR und des CD21-CD19-Komplexes bewirken und damit die B-Zell-Antwort verstärken. CD19 kann jedoch auch unabhängig von CD21 agieren (Bradbury et al., 1993). Phosphorylierung von Tyrosin-Resten im zytoplasmatischen Teil von CD19 durch die Tyrosin-Kinase Lyn führt u. a. zur Rekrutierung und Aktivierung der Phosphatidyl-3 Kinase (PI3K) und damit verbundenen Bildung von  $\text{PIP}_3$  aus  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  (Pauls et al., 2012). Hierdurch wird eine Bindung von Btk an  $\text{PIP}_3$  gefördert (Abb. 5). Zusätzlich amplifiziert phosphoryliertes CD19 die Aktivität von Lyn und Syk (Fujimoto et al., 1999 und 2000). Letztendlich bewirkt die Aktivierung von CD19 eine verstärkte Phosphorylierung von  $\text{PLC}\gamma 2$ , eine vermehrte Bildung von  $\text{InsP}_3$ , einen Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytosol, Stimulation der Protein-Kinase C und Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs (zusammengefasst in Tedder et al., 1997).

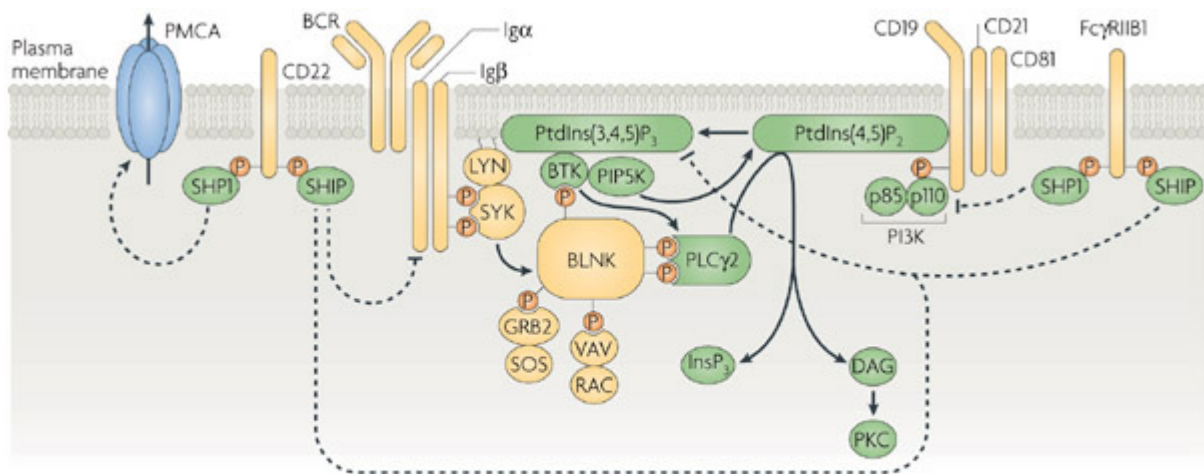
Auf Plasmazellen wurde die Rolle von CD19 als Ko-Rezeptor des BZR-Signalwegs bisher nicht untersucht. Historisch wird CD19 in der Literatur als Diskriminierungsmarker für maligne PZ angesehen, da Myelomzellen im Knochenmark kein CD19 exprimieren, während gesunde Plasmazellen in den meisten Studien als  $\text{CD19}^+$  beschrieben werden (Harada et al., 1993; Ishikawa et al., 2002). Andererseits weisen einige Studien auf die Ko-Existenz von  $\text{CD19}^+$  und  $\text{CD19}^{(-)}$  Plasmazellen im Knochenmark gesunder Probanden hin (Ellyard et al., 2004; Liu et al., 2012; Luque et al., 1998; Medina et al., 2002; Peceliunas et al., 2011;



Pellat-Deceunynck et al., 1994). Allerdings wurde CD19 in diesem Zusammenhang nur als Oberflächenmarker benutzt und nicht funktionell untersucht.

### 1.4.3 Inhibitorische Ko-Rezeptoren

Durch negative Regulation des BZR-Signalwegs nach dessen Aktivierung kann eine Überreaktion des Immunsystems verhindert werden. Dies wird durch die inhibitorischen Ko-Rezeptoren CD22 und FcγRIIB (CD32B) ermöglicht (Abb. 5). CD22 gehört zur Familie der Lektine, ist ein Rezeptor für N-Acetylneuraminsäure und wird spezifisch auf B-Zellen exprimiert (Crocker et al., 2007). Der zyttoplasmatische Teil dieses Transmembranproteins besitzt mehrere ITIMs (*immunoreceptor tyrosine inhibitory motifs*), welche nach Bindung von Antigen an den BZR-Komplex und der damit verbundenen Rekrutierung von CD22 durch Kinasen wie Lyn phosphoryliert werden können und auf diese Weise eine Bindung der Tyrosin-Phosphatase SHP1 an CD22 ermöglichen (Doody et al., 1995; Smith et al., 1998). Durch SHP1-vermittelte Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe PMCA bewirkt CD22 eine Reduzierung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels, welcher ein entscheidender Mediator des BZR-Signalwegs ist (Chen et al., 2004; Nitschke et al., 1997). Auch eine inhibitorische Wirkung von CD22 über die Phosphatase SHIP wird angenommen (Poe et al., 2000; Sato et al., 1997). Verlust der CD22-Funktion führt u. a. zu hyperreaktiven B-Zellen und autoimmunen Manifestationen in einigen Tiermodellen (Asano et al., 2004; O'Keefe et al., 1999). Im Verlauf der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen nimmt die Expressionsrate von CD22 ab, so dass dieser Rezeptor auf reifen Plasmazellen im Knochenmark nicht mehr nachweisbar ist (Medina et al., 2002).



Nature Reviews | Immunology

**Abb. 5: Beeinflussung des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs durch Ko-Rezeptoren.** Nach Antigenbindung an den B-Zell-Rezeptor werden intrazelluläre Signalmoleküle phosphoryliert und aktiviert. Der CD19-CD21-CD81-Komplex kann die Signalwirkung des B-Zell-Rezeptors verstärken, während CD22 und FcγRIIB eine inhibitorische Wirkung auf den B-Zell-Rezeptor-Signalweg ausüben. Details siehe Text. Entnommen aus Scharenberg et al. (2007).

Eine weitere inhibitorische Wirkung auf den BZR-Signalweg wird durch Ko-Ligation des BZR-Komplexes mit dem niedrigaffinen Rezeptor für IgG, FcγRIIB, erreicht

(Phillips und Parker, 1983; Tony und Schimpl, 1980; Wilson et al., 1987). Auch FcγRIIB besitzt intrazelluläre ITIMs, welche eine Rekrutierung von SHP1 und SHIP ermöglichen (D'Ambrosio et al., 1995; Ono et al., 1996; Tridandapani et al., 1997). Die Phosphatase SHIP bewirkt den Abbau von PIP<sub>3</sub> zu Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>) (Brauweiler et al., 2000; Phee et al., 2001) und beeinträchtigt somit die Bindung von Btk und die damit verbundene Aktivierung von PLCγ2. Es wird vermutet, dass die Rekrutierung von SHP1 an FcγRIIB zur Dephosphorylierung von CD19 führt (Fong et al., 2000; Hippen et al., 1997), jedoch scheint SHIP der Hauptmediator der inhibitorischen Wirkung von FcγRIIB zu sein (Fong et al., 1996; Isnardi et al., 2006; Ono et al., 1997). Auch auf Plasmazellen wird FcγRIIB exprimiert und kontrolliert hier die Sekretion von Ig. Zudem scheint FcγRIIB eine Rolle in der Homöostase von Plasmazellen im Knochenmark durch Feedback-Regulation nach Bindung von Immunkomplexen einzunehmen (Xiang et al., 2007). Ob und inwiefern der regulatorische Effekt von FcγRIIB bei Plasmazellen mit dem BZR-Signalweg in Verbindung gebracht werden kann, ist bisher jedoch nicht bekannt.

## 1.5 Ausgangslage und Zielsetzung der Arbeit

Wie in den vorangegangenen Kapiteln erläutert, bilden Plasmazellen eine tragende Komponente des adaptiven Immunsystems und sind entscheidend für die Bildung und Erhaltung der humoralen Immunität und des humoralen Gedächtnisses. Nichtsdestotrotz sind gerade im humanen System noch viele Fragen bezüglich der Plasmazell-Homöostase und ihrer Ansiedelung in Überlebensnischen des Knochenmarks (KM) nach wie vor ungeklärt und bieten ein herausforderndes und auch klinisch relevantes Forschungsgebiet. Ein besseres Verständnis der Plasmazellbiologie im Menschen sollte einen verbesserten Zugang zur Behandlung von Immundefizienz oder Autoimmunerkrankungen versprechen. Dies gab vor einigen Jahren in der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Dörner den Anlass, sich genauer der Beschreibung und Untersuchung *ex vivo* isolierter humaner Knochenmarks-Plasmazellen (KM PZ) zu widmen. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich diese Zellen bezüglich des BZR-Ko-Rezeptors CD19 unterscheiden: Während ein Teil der KM PZ noch CD19 auf der Oberfläche exprimiert, ist dieser Rezeptor auf dem anderen Teil der KM PZ nicht nachweisbar. Obwohl, wie in 1.4.2 beschrieben, bereits einige Studien sowohl CD19<sup>+</sup> als auch CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nachgewiesen haben, wurde in den entsprechenden Publikationen auf diese Beobachtung nicht näher eingegangen (Ellyard et al., 2004; Liu et al., 2012; Luque et al., 1998; Medina et al., 2002; Peceliunas et al., 2011; Pellat-Deceunynck et al., 1994).

Erste Untersuchungen der CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von gesunden Probanden ergaben, dass in der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Fraktion überwiegend IgG-sezernierende Plasmazellen enthalten sind, während die Mehrheit der CD19<sup>+</sup> KM PZ IgA produziert. Weitere Unterschiede zeigten sich in der Analyse der Mutationsfrequenzen: Obwohl beide Plasmazell-Populationen eine insgesamt hohe Mutationsrate aufwiesen, war

sowohl die Anzahl als auch die Frequenz der Mutationen in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant niedriger als in CD19<sup>+</sup> KM PZ (Mei et al., 2015). Diese Ergebnisse lieferten erste Anhaltspunkte dafür, dass es sich bei CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ um zwei voneinander abweichende Plasmazell-Fraktionen mit unterschiedlichen Eigenschaften handeln könnte.

Da Anzahl und Eigenschaften der PZ die Zusammensetzung und Spezifität sowie Dauer und Halbwertszeit des humoralen Immungedächtnisses bestimmen, wurde die Charakterisierung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zum Thema der vorliegenden Doktorarbeit gewählt, um zu einem besseren Verständnis derjenigen Faktoren beizutragen, die die Bildung und Erhaltung des humoralen Gedächtnisses beeinflussen. Eine genauere Untersuchung der CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ im gesunden humanen System erschien aus folgenden Gründen interessant: Die Expression von CD19 wird durch Pax5 reguliert (1.2.4) und ist charakteristisch für die B-Zelllinie. Durch Herunterregulation von Pax5 im Zuge der Plasmazell-Differenzierung wird CD19 auf Plasmazellen schwächer exprimiert als auf B-Zellen. Es wäre folglich möglich, dass der vollständige Verlust von CD19 auf einem Teil der KM PZ mit einem höheren Reifegrad dieser Zellen einhergeht. Da im KM neben langlebigen Plasmazellen auch kurzlebige Plasmazellen vorhanden sein können, wäre es denkbar, dass die CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Population eher das langlebige Kompartiment bildet, während CD19<sup>+</sup> KM PZ kurzlebige Antikörper-sezernierende Zellen repräsentieren. Zudem zeigt eine 2007 veröffentlichte Studie von Amanna et al., dass antivirale Antikörper-Titer eine wesentlich längere Halbwertszeit (bis zu mehrere Jahrtausende) aufweisen als Antikörper-Titer gegen Tetanus und Diphtherie, welche nur 11 bzw. 19 Jahre beträgt (Amanna et al., 2007). Die beiden anhand von CD19 unterscheidbaren KM PZ Populationen könnten also möglicherweise für diese unterschiedlichen Titer-Halbwertszeiten verantwortlich sein, indem sie verschiedene Antigen-Spezifitäten oder andere intrinsische Eigenschaften besitzen.

Auf Basis dieser Überlegungen war das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit eine vertiefende Charakterisierung dieser beiden KM PZ Populationen, wobei der Fokus auf das gesunde humane System gerichtet wurde. Folgende Fragen sollten im Verlauf der Arbeit adressiert werden:

- Welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede lassen sich allgemein zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ feststellen?
- Lässt sich der Verlust von CD19 auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ mit einem höheren Reifegrad dieser Zellen in Zusammenhang bringen?
- Leisten CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ einen unterschiedlichen Beitrag zu humoraler Immunität und humoralem Gedächtnis?
- Wie kann man die Entstehung von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ erklären?

Die im Rahmen der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollten schließlich der Erstellung eines Konzeptes dienen, welches zu einem besseren Verständnis der Plasmazellbiologie und der Mitwirkung unterschiedlicher Plasmazell-Populationen in der humoralen Immunität und dem humoralen Gedächtnis beiträgt.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Probenmaterial

Knochenmarkproben wurden von immunologisch gesunden Patienten (Alter zwischen 36 und 86 Jahren, Durchschnittsalter 66 Jahre; 108 Frauen mit Durchschnittsalter 65 Jahre, 75 Männer mit Durchschnittsalter 67 Jahre) im Rahmen einer Hüft-Totalendoprothese (Hüft-TEP) entnommen. Das hierbei anfallende und normalerweise verworfene Material wurde durch eine Kooperation mit der Klinik für Orthopädie der Charité Universitätsmedizin Berlin (Prof. Dr. Carsten Perka) und der *core facility „cell harvesting“* des BCRT (Dr. Simon Reinke, Antje Blankenstein) zu Forschungszwecken verwendet. Die Patienten galten als immunologisch gesund, wenn nach eigenen Angaben keine das Immunsystem betreffenden systemischen Erkrankungen vorlagen.

Weitere Knochenmarkproben wurden Säuglingen im Alter zwischen fünf und sieben Monaten bei der operativen Korrektur von Kraniosynostosen entnommen und mit Einwilligung der Eltern im Rahmen einer Kooperation mit der Abteilung für Kinderneurochirurgie am Campus Virchow-Klinikum der Charité (Dr. Karin Schwarz) für Forschungszwecke weiter verwendet.

Milzproben wurden nach elektiver Splenektomie oder Trauma-Operationen im Rahmen einer Kooperation mit der Chirurgischen Klinik am Campus Virchow-Klinikum der Charité erhalten. Zellen aus Tonsillen wurden nach routinemäßig durchgeführter Tonsillektomie von der Arbeitsgruppe Prof. Chiara Romagnani (DRFZ, Berlin) nach Erhalt aus der HNO-Klinik der Charité isoliert und unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Peripheres Blut wurde gesunden Probanden im Alter zwischen 23 und 62 Jahren entweder einmalig entnommen oder im Rahmen einer Vakzinierungsstudie vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach routinemäßiger Immunisierung mit Tetanustoxoid-Impfstoff (TT). Die TT-Immunisierung erfolgte frühestens sieben Jahre nach der letzten TT-Auffrischimpfung.

Alle Vakzinierungen und Blutabnahmen fanden nach Zustimmung der Probanden auf freiwilliger Basis statt. Auch die Spender der Tonsillen, Knochenmark- und Milz-Proben waren über die Verwendung ihres Materials aufgeklärt worden und hatten ihr Einverständnis hierzu erteilt. Für alle Projekte lagen Zustimmungen der Ethikkommission der Charité vor.

Bis zur Zellgewinnung wurden alle Proben maximal vier Stunden gelagert. Dabei wurde Vollblut bei Raumtemperatur aufbewahrt, Milz, Tonsille und Knochenmark hingegen möglichst ununterbrochen bei 4°C gekühlt.

## 2.2 Laborausrüstung

Folgende Geräte wurden für die Versuche benötigt:

**Tabelle 1: Übersicht der im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Geräte.**

Gerät	Hersteller
Sterilwerkbank Herasafe	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Labofuge 400	Thermo scientific
Heraeus Labofuge 400e	Thermo scientific
Heraeus Labofuge 400R	Thermo scientific
PCR Arbeitsplatz p-048-02	CBS Scientific, San Diego, CA, USA
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Reaxtop Mixer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
ABX Micros 60	Horiba, Irvine, CA, USA
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Canto II	BD, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	Haake, Berlin, Deutschland
Titramax 1000 Plattenschüttler	Heidolph
Laborwaage	Faust Laborbedarf, Schaffhausen, Schweiz
ELISpot-Auslesegerät	AID Diagnostika, Straßberg, Deutschland
Photometer	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA; Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermocycler "MyCycler"	BioRad, München, Deutschland
StepOnePlus real-time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Kühl- und Gefrierschränke (4°C, -20°C, -80°C)	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland

Zudem wurden folgende Materialien verwendet:

**Tabelle 2: Übersicht der im Rahmen der Doktorarbeit verwendeten Labormaterialien.**

Labormaterial	Hersteller
Einstellbare Einfach- und Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
FACS-Röhrchen (Polystyrol)	BD, Heidelberg, Deutschland; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1,5ml und 2ml Reagenzgefäß	Eppendorf
15ml und 50ml Zentrifugenröhrchen (Polypropylen)	BD
Cryoröhrchen (2ml)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Serologische Pipetten (Polystyrol)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen (2,5µl, 10, 100, 200, 1000µl, Plastik)	Eppendorf; Biozym
Sterilfilter (Porengröße ...)	BD
Petrischalen (Polystyrol)	Greiner Bio-One
96-er Zellkulturplatten (Polystyrol)	Greiner Bio-One
PCR Platten (96-Loch)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biorad, München, Deutschland
Mikrotiter-Platten für ELISA (Nunc)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MultiScreen Platten für ELISpot (MSIPN4510)	Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland
Pipetboy	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
pH-Messgerät	SI Analytics, Mainz, Deutschland
Ständermaterial	verschiedene Hersteller
Eisbehälter	verschiedene Hersteller
Messbecher, Bechergläser, Glasflaschen	verschiedene Hersteller
Schutzhandschuhe und -brille	verschiedene Hersteller

### 2.3 Puffer und Medien

In der folgenden Tabelle finden sich die Zusammensetzungen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Standard-Puffer und -Medien.

**Tabelle 3: Zusammensetzung und Hersteller von verwendeten Standardmedien und –puffern.**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	ddH <sub>2</sub> O (doppelt destilliert) 8000 mg/l NaCl 200 mg/l KCl 1150 mg/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 200 mg/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mg/l MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 100 mg/l CaCl <sub>2</sub>	Biochrom, Berlin, Deutschland; DRFZ, Berlin, Deutschland
PBS/BSA	PBS	Biochrom, DRFZ
	0,2% BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )	Biomol, Hamburg, Deutschland; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBE	PBS/BSA	siehe oben
	5 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich
PBS/BSA/Azid	PBS/BSA	siehe oben
	0,02% NaN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
RPMI Komplett-Medium	Gibco RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Glutamax	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
	10% FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	
	100 U/ml Penicillin	
	100 µg/ml Streptomycin	

## **2.4 Zellisolation**

### **2.4.1 Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Venöses Vollblut wurde in 10 ml EDTA-Röhrchen (BD, Heidelberg, Deutschland) aufgefangen und zunächst 30 min bei Raumtemperatur liegend ruhen gelassen. Anschließend wurde das Blut 1:2 (v/v) mit PBS verdünnt und in einem 50 ml Röhrchen je 30 ml Blut-PBS-Gemisch vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) geschichtet. Die Röhrchen wurden ohne Bremse 20 min bei Raumtemperatur und 500 x g zentrifugiert, wodurch sich mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) von Zellen mit höherer Dichte (Erythrozyten und Granulozyten) und geringerer Dichte (Thrombozyten) abtrennten. Nach der Zentrifugation wurde die Schicht mit den mononukleären Zellen (zwischen Sediment und Blutplasma) mit Hilfe einer Pipette in ein neues Röhrchen überführt und zweimal mit 30-40 ml kaltem PBS/BSA gewaschen (Zentrifugation mit Bremse 10 min bei 280 x g, 4°C). Schließlich wurde die erhaltene Zellkonzentration mittels ABX Micros 60 (Horiba, Irvine, CA, USA) bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden bei 4°C dunkel aufbewahrt und zeitnah weiter verarbeitet.

Zusätzlich zur Isolation mononukleärer Zellen wurde von allen Blutproben mit ABX Micros 60 ein kleines Blutbild erstellt und die B-Zellzahl pro  $\mu$ l mittels TruCOUNT (BD; Protokoll nach Herstellerangaben, siehe 2.5.4) ermittelt.

### **2.4.2 Isolation von Zellen aus Knochenmark**

Knochenmarkproben wurden mit einem Skalpell in einer Petrischale zerkleinert, mit PBE-Puffer (siehe Tabelle 3) gevortext und über einen sterilen 70  $\mu$ m Filter (BD, Heidelberg, Deutschland) gestrichen. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das Knochenmark seine rote Farbe verloren hatte. Die so gewonnene Zellsuspension wurde mit Lyse-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) 1:5 (v/v) gemischt und bei 4°C 15 min lang lysiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (280 x g, 15 min, 4°C), zweimal mit 30-40 ml PBE-Puffer gewaschen (Zentrifugation 10 min bei 280 x g, 4°C) und jedes Mal mit einem 30  $\mu$ m Filter (BD) filtriert. Alternativ wurden die Zellen für bestimmte Experimente durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland), wie unter 2.4.1 beschrieben, isoliert. Die Zellkonzentration der erhaltenen Suspension wurde mit ABX Micros 60 (Horiba, Irvine, CA, USA) ermittelt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen maximal zwei Stunden lang in PBE-Puffer bei 4°C dunkel gelagert.

### **2.4.3 Isolation von Zellen aus der Milz**

Milzstücke von ITP- oder Traumapatienten wurden zunächst mit einem Skalpell zerkleinert und mit einem Stempel in einer Petrischale zerdrückt. Die so gewonnene Zellmasse wurde in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und mit 25 ml PBS stark



gevoertext. Anschließend wurde die Zellsuspension über einen sterilen 70 µm Filter gegeben, mit 15 ml Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) unterschichtet und die mononukleären Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation wie unter 2.4.1 beschrieben gewonnen.

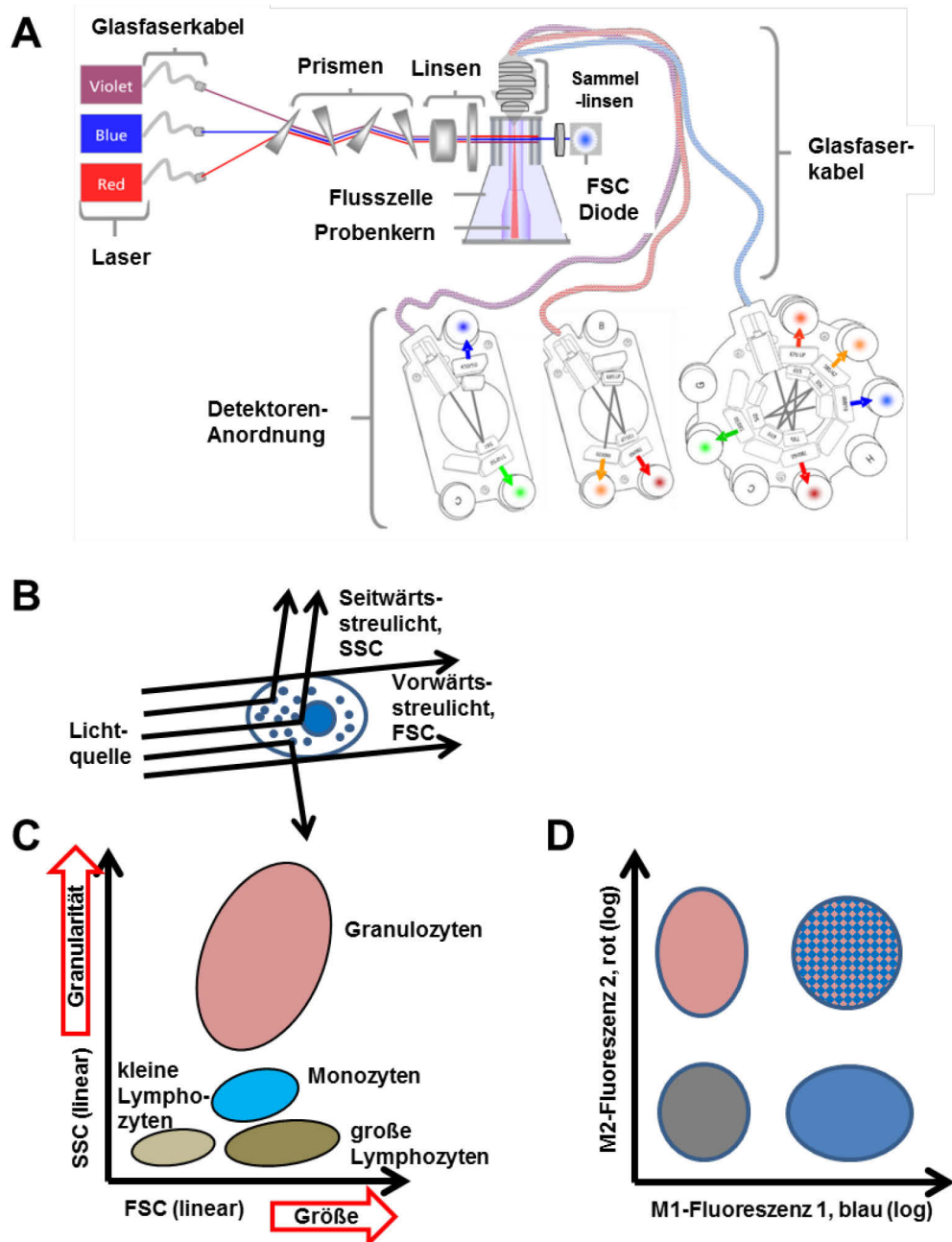
## 2.5 Durchflusszytometrische Analysen

### 2.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Grundlage der Durchflusszytometrie ist die individuelle Analyse von Fluoreszenzmarkierten Zellen in einer Suspension anhand ihrer optischen Signale nach Anregung durch einen Laserstrahl. Hierfür werden Zellen in den Mikrokanal einer Messküvette geleitet, hydrodynamisch fokussiert und einzeln am Messbereich eines Laserstrahls vorbei geführt. Dabei entsteht je nach Zellbeschaffenheit ein charakteristisches Fluoreszenzsignal und/oder Streulicht, welches von einem Detektorsystem erfasst und mittels Analysesoftware bildlich dargestellt wird. (Abb. 6A) Innerhalb eines kurzen Zeitraums kann somit eine große Anzahl an Zellen analysiert und Informationen über Zellpopulationen gewonnen werden.

Das Vorwärtstreulicht (FSC, *forward scatter*) wird (fast) im Winkel des ursprünglichen Strahls gemessen und gibt Auskunft über die Größe bzw. das Volumen einer Zelle, während das Seitwärtstreulicht (SSC, *side scatter*) etwa im rechten Winkel zum ursprünglichen Strahl gemessen wird und von der Granularität und Komplexität der Zelle abhängt (Abb. 6B, C). Zusätzlich können Fluoreszenzfarben gemessen werden. Diese sind in der Regel an Antikörper gekoppelt, welche spezifische Zellstrukturen erkennen und binden. Anhand des emittierten Lichts lässt sich auf diese Weise ermitteln, welche Moleküle von bestimmten Zellen exprimiert werden (Abb. 6D). Durch den Einsatz von Lasern verschiedener Wellenlänge und unterschiedlichen Filtern kann die Anzahl der einsetzbaren Fluoreszenzfarbstoffe und folglich auch die Informationsdichte erhöht werden.

Eine Erweiterung der Durchflusszytometrie stellt die Sortierung von Zellen anhand von Fluoreszenzsignalen dar. Diese Technik wurde von Leonard A. Herzenberg entwickelt (Hulett et al., 1969) und ist heutzutage unter der Bezeichnung FACS Sorting (*fluorescence-activated cell sorting*, eingetragenes Warenzeichen von Becton Dickinson, BD) bekannt. Hierbei wird das Streu- und Fluoreszenzlicht von Zellen nicht nur gemessen und am Computer visualisiert; die Zellen werden anhand dieser Eigenschaften zusätzlich in verschiedene Fraktionen aufgeteilt und in separaten Röhrchen aufgefangen, wodurch sie für Folgeexperimente weiter verwendet werden können. Die Sortierung erfolgt durch Vereinzelung der Zellen in kleine Tröpfchen, welche durch ein elektrisches Feld geleitet werden. Enthält ein Tröpfchen eine zu sortierende Zelle, wird es vor dem Durchtritt durch das elektrische Feld geladen, sodass es in ein anderes Gefäß fällt als nicht zu sortierende Zellen.



**Abb. 6: Prinzip der Durchflusszytometrie und schematische Darstellung durchflusszytometrischer Daten.** (A) Aufbau eines BD FACS Canto II Durchflusszytometers, modifiziert nach [http://www.bdbiosciences.com/services/training/itf\\_launch.jsp](http://www.bdbiosciences.com/services/training/itf_launch.jsp). Eine Probe mit fluoreszenzmarkierten Zellen wird durch eine Flusszelle geleitet, wo die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt werden. Nach Anregung der Zellen mit Laserlicht wird das emittierte Streu- und Fluoreszenzlicht der Zellen von einem Detektorensystem erfasst und in elektronische Signale umgewandelt. (B) Die Größe einer Zelle korreliert mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter), das durch Beugung eines Lichtstrahls im flachen Winkel entsteht. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) entsteht durch Brechung des einfallenden Lichtstrahls im rechten Winkel und gibt Auskunft über die Granularität einer Zelle. Die so erfassten Informationen können in einem Diagramm zweidimensional dargestellt werden (C). (D) Schematische Darstellung eines Diagramms mit zwei Fluoreszenzparametern für je ein bestimmtes Molekül (M1, M2). Ein Teil der gemessenen Zellen exprimiert weder Molekül M1, noch Molekül M2 (grau) und ist somit doppelt negativ für beide Fluoreszenzsignale. Ein anderer Teil exprimiert M1, aber nicht M2 (blau), während ein dritter Teil der Zellen zwar M2, aber nicht M1 exprimiert (rot). Eine vierte Zellfraktion exprimiert beide Moleküle und ist somit doppelt positiv für die angegebenen Fluoreszenzsignale (rot und blau). Modifiziert nach Mei (2009b, S. 36).

### 2.5.2 Färbung von Zellen für durchflusszytometrische Analysen

Zur Bestimmung der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle wurden Zellsuspensionen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und am FACS Canto II Durchflusszytometer (BD, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Hierzu wurden je 1-2 Mio. Zellen in 20-100 µl PBE (Knochenmarkzellen) oder PBS/BSA in ein FACS-Röhrchen überführt und je nach Fragestellung mit einer Kombination der in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper gefärbt. Die optimale Antikörperkonzentration sowie Inkubationszeit und -temperatur wurden zuvor in Etablierungsversuchen ermittelt. Nach der Färbung wurden die Zellen mit je 1 ml PBE oder PBS/BSA gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 280 x g, 4°C), um ungebundene Antikörper zu entfernen, und in 250 µl PBS/BSA resuspendiert. Die Messung der Zellen am Durchflusszytometer erfolgte zeitnah nach der Färbung. Bis dahin wurden die Zellen dunkel und kühl gelagert. Durch Zugabe von Dapi unmittelbar vor der Analyse konnten tote Zellen von lebenden Zellen abgegrenzt werden.

Für intrazelluläre Färbungen wurden zunächst Oberflächenmoleküle wie oben beschrieben angefärbt, anschließend wurden die Zellen mit je 1 ml PBS gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 280 x g, 4°C), um ungebundene Antikörper und restliches BSA zu entfernen. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen in 100 µl 2% Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen zur Permeabilisierung in 0,5% Saponinlösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, gelöst in PBS/BSA/Azid-Puffer) resuspendiert und mit Antikörpern zur Detektion intrazellulärer Moleküle gefärbt. Nach Waschen mit 0,1% Saponinlösung wurden die Zellen in PBS/BSA resuspendiert und am FACS Canto II (BD, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Bei Verwendung sekundärer Antikörper wurde die Anzahl der Inkubations- und Waschschrte entsprechend angepasst.

Die Bindungsspezifität der verwendeten Antikörper wurde bei Bedarf durch Isotypkontrollen oder FMO (*fluorescence minus one*)-Kontrollen überprüft.

**Tabelle 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper und Reagenzien für durchflusszytometrische Analysen.**

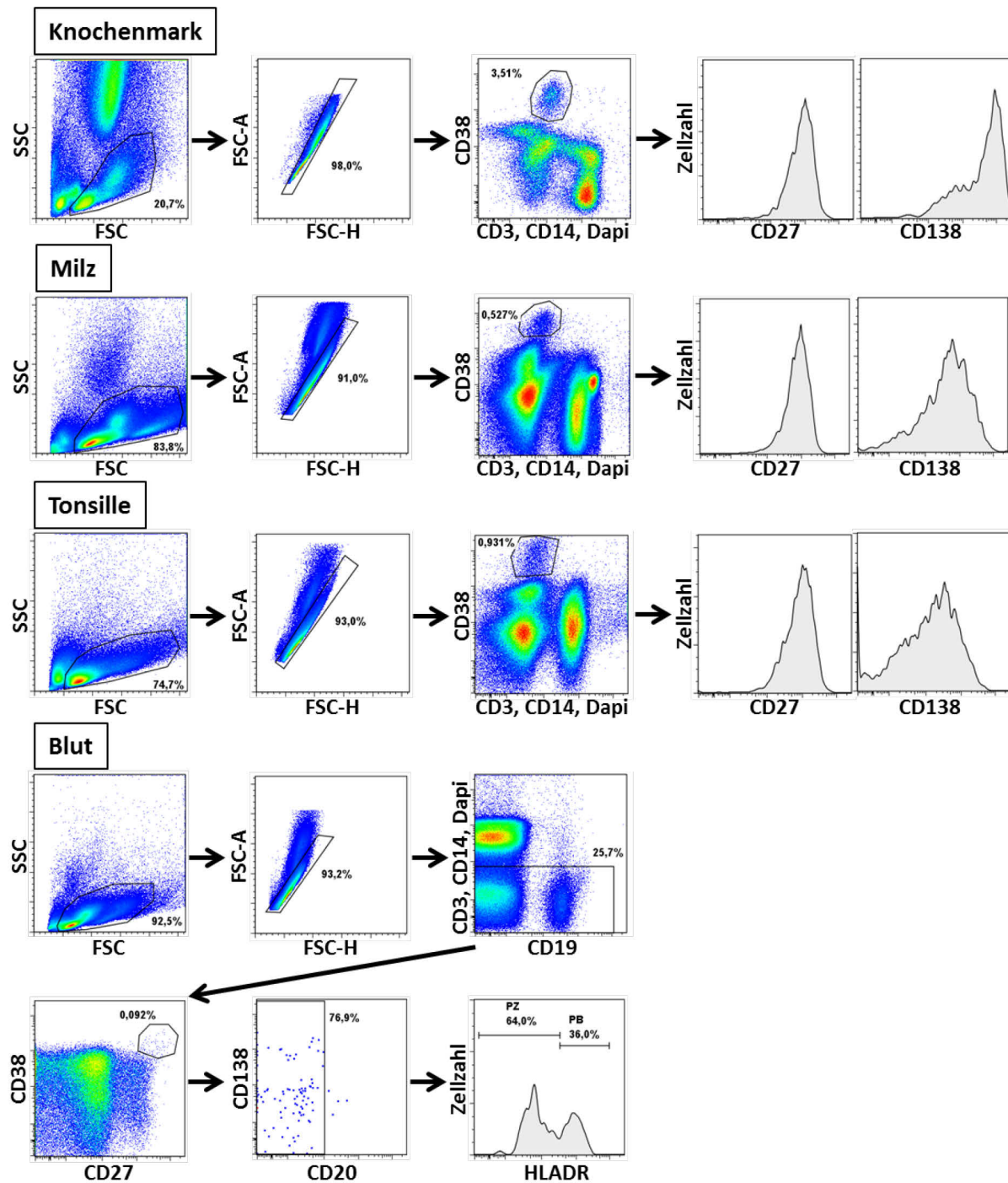
Anti-körper (Anti-) oder Reagenz	Konjugat	Klon	Hersteller
CD3	PacB	UCHT1	BD, Heidelberg
	APC-H7	SK7	BD
CD9	FITC	MM2/57	Chemicon, Billerica, MA, USA
CD14	PacB	M5E2	BD
	V450	M5E2	BioLegend, San Diego, CA, USA
	APC-H7	MOP9	BD
CD19	PE-Cy7, APC-H7	SJ25C1	BD
CD20	FITC	2H7	BD
	PacO	HI47	Invitrogen, Freiburg
	PerCp	L27	BD
CD21 (CR2)	PE	B-ly4	BD
CD22	FITC	HIB22	BD
CD27	FITC	M-T271	BD
	FITC, APC	L128	BD
CD28	FITC	CD28.2	BD
CD31 (Pecam-1)	PE	WM59	BD
CD32	FITC	FLI8.26	BD
CD32B (FcγRIIB)	APC	2B6	Falk Nimmerjahn, Erlangen
CD38	FITC, APC	HIT2	BD
CD44	FITC	L178	BD
CD45	PE	HI30	BioLegend
	PerCp-Cy5.5	2D1	BD

CD56 (NCAM)	PE	AF12-7H3	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
CD69	PE	L78	BD
CD81	PE	JS-81	BD
CD93	FITC	R139	BD
CD95	FITC	DX2	BD
CD99	FITC	TÜ12	BD
CD138	PE, APC	B-B4	Miltenyi
CD146 (MCAM)	FITC	128018	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
HLADR	FITC, APC-Cy7	L243	BioLegend
HLA-ABC	FITC	G46-2.6	BD
S1PR1	PE	218713	R&D
Ki67	FITC	MIB-1	Dako, Hamburg
Bcl2	PE	Bcl-2/100	BD
Syk	FITC	4D10	BD
Syk (Y348)	PE	II20-722	BD
Zap70 (Y319) / Syk (Y352)	PE	17A/P-ZAP70	BD
PLCy2 (Y759)	Alexa Flour 488	K86-689.37	BD
Btk (Y551)	PE	24a/BTK	BD
IgG	PE-Cy7	G18-145	BD
IgA	Biotin	G20-359	BD
β7 Integrin	PE	FIB504	BD
β1 Integrin (CD29)	PE	MAR4	BD
CD62L	FITC	145/15	Miltenyi
CCR9	PE	112509	R&D
CCR10	PE	314305	R&D
Strept-avidin	PerCp, FITC	-	BD
TT	Cy5	-	DRFZ, Berlin

### 2.5.3 Durchflusszytometrische Detektion von Plasmablasten und Plasmazellen

Zur Detektion von Plasmablasten (PB) und Plasmazellen (PZ) in verschiedenen Geweben wurden die gemessenen Zellen zunächst stets auf kleine und große Lymphozyten eingegrenzt und Zellaggregate über FSC-A versus FSC-H ausgeschlossen. PB und PZ im Blut wurden anschließend anhand der starken Expression von CD27 und CD38 sowie Abwesenheit von CD3, CD14, Dapi und CD20 detektiert. PB konnten durch starke Expression von HLADR von reifen PZ abgegrenzt werden, welche nur eine geringe HLADR-Expression aufweisen (Odendahl et al., 2005). PZ in Tonsille und Milz wurden gemäß des Phänotyps  $CD3^{(-)}$   $CD14^{(-)}$   $Dapi^{(-)}$   $CD38^{stark}$  bestimmt. Sie zeigten darüber hinaus starke Expression von CD27 und intermediäre Expression von CD138. KM PZ wurden ebenfalls als  $CD38^{stark}$  exprimierende Zellen identifiziert, nachdem  $CD3^{+}$  T-Zellen,  $CD14^{+}$  Monozyten und  $Dapi^{+}$  apoptotische Zellen ausgeschlossen worden waren. Zudem exprimierten KM PZ CD27 und CD138 (Abb. 7). Die Expression von intrazellulärem Immunglobulin wurde durch  $\kappa/\lambda$ -Färbung exemplarisch bestätigt.

Im KM konnten  $CD19^{+}$  PZ von  $CD19^{(-)}$  PZ anhand des bimodalen Kurvenverlaufs der CD19-Expression abgegrenzt werden. Wenn kein bimodaler Kurvenverlauf vorhanden war, wurde die Grenze für  $CD19^{(-)}$  PZ anhand einer FMO-Kontrolle gesetzt. In Blut-, Tonsillen- und Milzproben wurden  $CD19^{+}$  und  $CD19^{(-)}$  PB/PZ entweder mittels FMO-Kontrolle oder anhand des Schnittpunktes aus den Kurvenverläufen von CD19-exprimierenden Zellen und CD19-nicht exprimierenden Lymphozyten ermittelt (Abb. 8).



**Abb. 7: Exemplarische Darstellung des Nachweises von PB/PZ in verschiedenen Geweben bei durchflusszytometrischen Analysen.** Zunächst erfolgte die Eingrenzung der gemessenen Zellen auf kleine und große Lymphozyten und der Ausschluss von Zellaggregaten. Anschließend wurden PZ anhand ihrer starken Expression von CD38 identifiziert. PZ zeigten zudem starke Expression von CD27 und je nach Gewebe unterschiedliche Expressionsstärke von CD138. Im Blut wurden PZ als HLADR<sup>schwach</sup> exprimierende Zellen von HLADR<sup>stark</sup> exprimierenden PB abgegrenzt. Details siehe Text (2.5.3).

### 2.5.4 Zellzahlbestimmung mittels TruCOUNT-Methode

Um die Anzahl an B-Zellen pro  $\mu\text{l}$  Blut zu bestimmen, wurde das TruCOUNT-System von BD (Heidelberg, Deutschland) nach Hersteller-Angaben verwendet. Hierzu wurden 20  $\mu\text{l}$  Antikörpermix, bestehend aus 3,5  $\mu\text{l}$  Anti-CD45-PerCp-Cy5.5, 2  $\mu\text{l}$  Anti-CD19-PE, 2  $\mu\text{l}$  Anti-CD20-FITC, 1  $\mu\text{l}$  Anti-CD14-PacB (siehe Tabelle 4) und 11,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , mit 50  $\mu\text{l}$  Vollblut auf das Gitter eines TruCOUNT-Röhrchens pipettiert und vorsichtig mit den enthaltenen fluoreszenten Kügelchen (*beads*) vermischt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden 450  $\mu\text{l}$  1x FACS Lysepuffer (BD) hinzugegeben und weitere 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Analyse der Zellen erfolgte im Anschluss am FACS Canto II (BD), wobei B-Zellen als  $\text{CD45}^+ \text{CD14}^{(-)} \text{CD20}^+ \text{CD19}^+$  eingegrenzt wurden. Die Quantifizierung der B-Zellen pro  $\mu\text{l}$  Vollblut erfolgte anschließend nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Anzahl an gemessenen B-Zellen}}{\text{Anzahl an gemessenen beads}} \times \frac{\text{Gesamtzahl an beads pro Test}}{0,02 (\text{Testvolumen})} = \text{Absolutzahl an B-Zellen [pro } \mu\text{l]}$$

### 2.5.5 Plasmazell-Anreicherung per MACS und Sortierung von $\text{CD19}^+$ und $\text{CD19}^{(-)}$ KM PZ mittels FACS

Für bestimmte Experimente war es erforderlich, Plasmazellen möglichst rein von anderen Knochenmarkzellen zu isolieren und in eine  $\text{CD19}^+$  und eine  $\text{CD19}^{(-)}$  PZ Fraktion aufzuteilen. Hierzu wurden Knochenmarkzellen zunächst, wie unter 2.4.2 beschrieben, gewonnen und anschließend  $\text{CD138}^+$  Zellen mittels MACS (*magnetic activated cell sorting*) angereichert. Dies erfolgte nach Herstellerangaben durch Inkubation der Knochenmarkzellen mit Anti-CD138-*microbeads* (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland) und anschließender Aufreinigung der  $\text{CD138}^+$  Fraktion über eine LS MACS Säule (Miltenyi). Die erhaltene Fraktion mit  $\text{CD138}^+$  Zellen wurde daraufhin mit Antikörpern gegen CD19, CD20, CD38, CD138, CD3 und CD14 bei  $4^\circ\text{C}$  15 min lang im Dunkeln gefärbt, mit PBS/BSA gewaschen (Zentrifugation  $280 \times g$ , 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ) und je nach Zelldichte in 300-500  $\mu\text{l}$  PBS/BSA resuspendiert. Nach Zugabe von Dapi wurden die Zellen in der *flow cytometry core facility* (FCCF) des DRFZ an einem FACS-Gerät (FACS Aria I oder FACS Aria II, BD, Heidelberg, Deutschland) in eine  $\text{CD3}^{(-)} \text{CD14}^{(-)} \text{Dapi}^{(-)} \text{CD20}^{(-)} \text{CD38}^{\text{stark}} \text{CD138}^+ \text{CD19}^+$  PZ Fraktion und eine  $\text{CD3}^{(-)} \text{CD14}^{(-)} \text{Dapi}^{(-)} \text{CD20}^{(-)} \text{CD38}^{\text{stark}} \text{CD138}^+ \text{CD19}^{(-)}$  PZ Fraktion sortiert. Dabei wurden die Zell-Fraktionen in separaten, mit FCS beschichteten FACS-Röhrchen aufgefangen, in denen je nach Folgeexperiment 300  $\mu\text{l}$  PBS/BSA oder RPMI Medium vorgelegt war.

### 2.5.6 Durchflusszytometrische Messung von Zellen im Grundzustand

Um den Phosphorylierungsstatus intrazellulärer Moleküle, wie z. B. Syk, im Grundzustand (also ohne Zellstimulation) ermitteln zu können, musste eine Beeinflussung der Zellen durch die unter 2.4 genannten Isolationsprozesse

bestmöglich vermieden werden. Hierzu wurden KM-Proben in kleine Stücke geschnitten, mit ca. 30 ml PBE gevortext und die Zellmasse über sterile Filter mit der Porengröße 70 µm (BD, Heidelberg, Deutschland) gestrichen. Je 500 µl der erhaltenen Zellsuspension wurde anschließend mit 1 ml vorgewärmtem 1x Fix/Lyse-Puffer (BD) 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um Erythrozyten zu lysieren und die Zellen zu fixieren. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 280 x g). Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und am FACS Canto II (BD) analysiert. Für intrazelluläre Untersuchungen erfolgte zusätzlich ein Permeabilisationsschritt vor der Antikörper-Färbung, je nach Fragestellung wie unter 2.5.2 oder 2.9.1 beschrieben.

## **2.6 Kultivierung von KM PZ mit überlebensfördernden Faktoren**

KM PZ wurden, wie unter 2.5.5 beschrieben, isoliert und in eine CD19<sup>+</sup> und eine CD19<sup>(-)</sup> Zellfraktion sortiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (280 x g, 5 min, 4°C), in RPMI Komplett-Medium resuspendiert und in die Vertiefungen einer 96-Loch-Rundboden-Kulturplatte eingesät, wobei die Zell-Konzentration pro Well innerhalb einer Zellfraktion konstant gehalten wurde. Je nach Ausbeute der Sortierung wurden so zwischen 300 und 1700 Zellen pro 200 µl Medium je Well eingesät. Zusätzlich wurden Zytokine in verschiedenen Kombinationen in folgenden Konzentrationen beigefügt: CXCL12 (R&D, Minneapolis, MN, USA) 1 µg/ml, APRIL und BAFF (Peprotech, Hamburg, Deutschland) je 500 ng/ml und IL6 (Peprotech) 1 ng/ml. Die optimale Zytokin-Konzentration wurde zuvor in unabhängigen Experimenten durch Titration ermittelt. Als Kontrolle diente die Kultivierung von KM PZ in RPMI Komplett-Medium ohne Zugabe von Zytokinen. Die Zellen wurden nun bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. An den Tagen 0, 1, 5, 9 und 14 wurden von jeder Zellfraktion und jedem Stimulationsansatz die Inhalte von drei Wells vollständig entnommen, in FACS-Röhrchen überführt, mit Antikörpern gegen CD38, CD138 und CD19 gefärbt, nach Zugabe von Dapi und einer konstanten Menge an *countbright counting beads* (Invitrogen, Freiburg, Deutschland) am Durchflusszytometer analysiert und die Zahl der lebenden Dapi<sup>(-)</sup> KM PZ durch Normalisierung auf die gemessene Anzahl an *counting beads* bestimmt.

## **2.7 Nachweis spezifischer Antikörper mittels ELISA**

Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ist ein Nachweisverfahren, mit dessen Hilfe Proteine, Viren oder niedermolekulare Verbindungen in einer Probe detektiert werden können. Durch die Bindung von an Enzyme gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Epitope auf nachzuweisenden Antigenen oder Antikörpern und einer anschließenden Farbreaktion kann die Konzentration des Analyts mit einem Photometer quantitativ bestimmt werden.



**Tabelle 5: Verwendete Materialien für Gesamt-IgG- bzw. Gesamt-IgA-ELISA.**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Beschichtungspuffer	NaHCO <sub>3</sub> 1,46 g	Merck, Darmstadt, Deutschland
	NaCl 4,5 g	Geyer, Renningen, Deutschland
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,8 g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	add 500 ml ddH <sub>2</sub> O, pH 9,6	DRFZ, Berlin, Deutschland
20xTBS (Tris-buffered saline)	0,9% NaCl, 0,1 M Tris/HCl,	Geyer; Roth
	ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4	DRFZ
Blockpuffer	1xTBS/2%BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Waschpuffer	1xTBS/0,02%Tween20	Sigma-Aldrich
Reaktionspuffer	96 ml Ethanolamin	Merck
	49 mg MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Roth
	add 1l ddH <sub>2</sub> O, pH 9,8	DRFZ
Substrat	pNPP (para-Nitrophenyl-Phosphat) 1 mg/ml in Reaktionspuffer	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Mensch IgG	5 µg/ml in Beschichtungspuffer	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Mensch IgA		Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Großbritannien
Ziege-anti-Mensch IgG-AP (Alkalische Phosphatase)	0,1 µg/ml in 1xTBS/0,2%BSA	Jackson ImmunoResearch
Ziege-anti-Mensch IgA-AP (Alkalische Phosphatase)		

Für den Nachweis *in vitro* sezernierter Gesamt-IgG- oder Gesamt-IgA-Antikörper wurden entweder mononukleäre Knochenmark-Zellen in RPMI Komplett-Medium bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> inkubiert und die Zellkulturüberstände nach 48 h abgenommen oder CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, wie unter 2.5.5 beschrieben, isoliert und in jeweils gleichen Zellkonzentrationen in RPMI Komplett-Medium mit 1 µg/ml CXCL12, je 500 ng/ml BAFF und APRIL und 1 ng/ml IL6 bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> inkubiert und die Zellkulturüberstände nach sieben Tagen abgenommen. Die Lagerung der Überstände bis zur Analyse erfolgte bei -80°C. Die Vertiefungen von Mikrotiterplatten

wurden mit 50 µl/Well Anti-IgG- bzw. Anti-IgA-Antikörperlösung über Nacht bei 4°C beschichtet und unspezifische Bindungsstellen anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit 200 µl/Well Blockpuffer abgesättigt. Nach Waschen der Platte mit 200 µl/Well 1x TBS wurden die Zellkulturüberstände zu je 50 µl/Well in die Mikrotiterplatten gefüllt. Als Positivkontrolle wurde humanes Serum in RPMI Komplett-Medium verdünnt, als Negativkontrolle diente RPMI Komplett-Medium, das ggf. mit den in der Zellkultur verwendeten Stimulanzen versetzt wurde. Für alle Proben und Kontrollen wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Proben wurden nun 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit 200 µl/Well Waschpuffer gewaschen und mit 50 µl/Well enzymgekoppelten Detektionsantikörperlösungen abermals 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (300 rpm) inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 200 µl/Well Waschpuffer folgte die Zugabe des Substrats mit 50 µl/Well. Die hierdurch induzierte Farbreaktion wurde schließlich an einem Photometer mit der Analyse-Software SoftMaxPro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) gemessen, wobei die Farbintensität als optische Dichte (OD) bei geeigneter Wellenlänge (hier 405 nm) angegeben wurde. Die OD ist dabei proportional zur Bindung der spezifischen Antikörper an das Antigen in der Festphase.

Um die Sekretionsmenge antigenspezifischer Antikörper durch CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zu überprüfen, wurden CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zunächst, wie unter 2.5.5 beschrieben, isoliert und in jeweils gleichen Zellkonzentrationen in RPMI Komplett-Medium mit 1 µg/ml CXCL12, je 500 ng/ml BAFF und APRIL und 1 ng/ml IL6 bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> inkubiert und die Zellkulturüberstände nach sieben Tagen abgenommen. Bis zur Analyse der Überstände per ELISA wurden diese bei -80°C gelagert. Zur Detektion Tetanus-spezifischer Antikörper wurde der „Anti-Tetanus-Toxoid ELISA (IgG)“ Kit verwendet, Mumps-spezifische Antikörper wurden mit dem „Anti-Mumps-Viren ELISA (IgG)“ Kit und Masern-spezifische Antikörper mit dem „Anti-Masern-Viren ELISA (IgG)“ Kit (alle von Euroimmun, Lübeck, Deutschland) nachgewiesen. Die Durchführung der ELISAs erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers. Das Auslesen der Platten fand am „Sunrise“ Photometer (Tecan, Männedorf, Schweiz) mit Hilfe der Software „Magellan 3“ (Tecan) statt.

## **2.8 Nachweis antigenspezifischer Antikörper-sezernierender Zellen mittels ELISpot**

Der ELISpot (*enzyme-linked immunospot*)-Assay dient dem Nachweis und der Quantifizierung Antikörper-sezernierender Plasmablasten oder Plasmazellen durch Immobilisierung der Antikörper auf einer Membran. Das Prinzip ist vergleichbar mit dem ELISA-Verfahren, jedoch können mittels ELISpot die Antikörper-sezernierenden Zellen einzeln sichtbar gemacht und so deren Anzahl genau bestimmt werden.

**Tabelle 6: Verwendete Materialien für ELISpot.**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Waschpuffer	PBS	DRFZ, Berlin, Deutschland
	1%BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
	0,05%Tween20	Sigma-Aldrich
Blockpuffer	PBS/3%BSA	DRFZ; Sigma-Aldrich
Azetatpuffer	0,2 M Natriumazetat/0,2 M Essigsäure, ddH <sub>2</sub> O, pH 5	Sigma-Aldrich; DRFZ
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMF	Dimethylformamid	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	
SA-HRP	Streptavidin - <i>horseradish peroxidase</i> – Konjugat 1 µg/ml in PBS	
EtOH	35% in ddH <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methyl-BSA	10 µg/ml in PBS, pH 7,2	Serva, Heidelberg, Deutschland

Zunächst wurden die Membranen der Platten mit 15 µl/Well EtOH 1 min lang befeuchtet, die Flüssigkeit ausgeklopft und die Platten dreimal mit 200 µl/Well PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Beschichtung der Membranen mit Antikörpern oder Antigenen (Tabelle 7) – je nachdem, ob der Isotyp der sezernierten Antikörper oder die Antikörper-Spezifität bestimmt werden sollte – mit 50 µl/Well 1 h bei 37°C. Vor der Beschichtung mit doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (dsDNA) war eine Behandlung der Membran mit Methyl-BSA 2 h bei 37°C erforderlich. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Platte mit 200 µl/Well PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit 200 µl/Well Blockpuffer bei 4°C über Nacht abgesättigt. CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ wurden, wie unter 2.5.5 beschrieben, isoliert und in RPMI Komplet-Medium in einer zuvor definierten Zellkonzentration aufgenommen. Nachdem der Blockpuffer entfernt und die Platte mit PBS gewaschen war, wurden je 50 µl/Well Zellsuspension in die Vertiefungen der Platte gefüllt und über Nacht bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Negativkontrolle diente RPMI Komplet-Medium ohne Zellen, als Positivkontrolle wurde humanes Serum, 1:300 (v/v) in RPMI Komplet-Medium verdünnt, verwendet. Für jede zu bestimmende Antikörper-Spezifität wurden mindestens vier Replikate pro Experiment bestimmt, für die Kontrollen wurden mindestens Duplikate ermittelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch intensives Waschen mit 200 µl/Well Waschpuffer entfernt und die Platte mit 50 µl/Well Lösungen der biotinylierten Detektionsantikörper (Tabelle 7) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte erneutes dreimaliges Waschen der Platte mit

PBS sowie die Inkubation mit 50 µl/Well SA-HRP für 30 min bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wurde eine AEC-Tablette in 2 ml DMF gelöst und 1 ml dieser Lösung tropfenweise in 30 ml Azetatpuffer verdünnt. Die AEC/DMF/Azetat-Lösung wurde steril filtriert und je 22 ml mit 12 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt. Je 100 µl/Well dieser Entwicklerlösung wurden nun in die Vertiefungen der Platte gefüllt. Es folgte eine ca. 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln, bis sich auf den Membranen rötlich gefärbte Punkte abzeichneten. Dann wurde der Plastikboden der Platte entfernt, die Platte gründlich von allen Seiten mit deionisiertem Wasser gewaschen und im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet. Die Analyse der Platte am ELISpot-Lesegerät erfolgte nach 1-2 Tagen, die Anzahl der gemessenen Spots wurde mit Immunospot-Software oder AID-Software bestimmt.

**Tabelle 7: Für den ELISpot-Assay verwendete Antikörper und Antigene.**

Antikörper bzw. Antigen	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Ziege-anti-Mensch IgG	5 µg/ml in PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ziege-anti-Mensch IgM		
Ziege-anti-Mensch IgA		
Tetanus Toxoid (TT)	21,5 LF/ml in PBS	
Epstein-Barr-Virus (EBV)	2 µg/ml in PBS	ASU Biodesign Institute, Tempe, Arizona, USA
Masern		
Mumps		
dsDNA	5 µg/ml in PBS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Biotinyliertes Ziege-anti-Mensch IgG	1 µg/ml in PBS/1%BSA/0,05%Tween20	Sigma-Aldrich
Biotinyliertes Ziege-anti-Mensch IgM	2 µg/ml in PBS/1%BSA/0,05%Tween20	
Biotinyliertes Ziege-anti-Mensch IgA	2 µg/ml in PBS/1%BSA/0,05%Tween20	

## 2.9 B-Zell-Rezeptor-Stimulation

### 2.9.1 Nachweis der Funktionalität von Signalwegen durch PhosphoFlow

Um eine mögliche Aktivierung des B-Zell-Rezeptors (BZR) anhand der Phosphorylierung intrazellulärer Signalmoleküle zu untersuchen, wurde phosphospezifische Durchflusszytometrie (auch PhosphoFlow-Verfahren genannt) eingesetzt. Hierbei werden Antikörper benutzt, die spezifisch an intrazellulär

phosphorylierte Proteine binden. In Kombination mit Oberflächenmarkern kann somit die Phosphorylierung mehrerer Moleküle gleichzeitig auf Einzelzellniveau mit Zuordnung einzelner Zellpopulationen detektiert werden.

**Tabelle 8: Verwendete Stimulations-Antikörper und –Konditionen für PhosphoFlow.**

Antikörper	Klon	Hersteller	Endkonzentration	Stimulationsdauer bei PhosphoFlow
Ziege-anti-Mensch IgG (Fcγ-Fragment-spezifisch)	polyklonal	Jackson Immunoresearch, Newmarket, Großbritannien	10 µg/ml in RPMI	5 min
Ziege-anti-Mensch IgA (α-Ketten-spezifisch)	polyklonal	Jackson Immunoresearch	10 µg/ml in RPMI	5 min
Ziege-anti-Mensch IgG+IgA+IgM (F(ab)2 Fragment)	polyklonal	Jackson Immunoresearch	30 µg/ml in RPMI	5 min
Maus-anti-Mensch CD19	SJ25C1	BD, Heidelberg, Deutschland	25 µl/ml in RPMI	45 min

Zunächst wurden mononukleäre Zellen aus Knochenmark wie unter 2.4.2 beschrieben mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Je  $2 \times 10^6$  Zellen wurden in 100 µl RPMI Medium resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und im Wasserbad bei 37°C mindestens 45 min äquilibriert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen durch Zugabe von 100 µl Antikörperlösung für eine definierte Zeitspanne (siehe Tabelle 8) bei 37°C im Wasserbad. Als Negativkontrolle diente eine unstimulierte Probe, bei der statt Antikörperlösung nur RPMI Medium zugeführt wurde. Die optimale Dauer der Stimulation von B-Zellen und KM PZ wurde zuvor in unabhängigen Experimenten durch die Erstellung von Kinetiken ermittelt. Bei Stimulation mit Anti-CD19 und Anti-IgG/IgA/IgM wurde zunächst 100 µl Antikörperlösung mit Anti-CD19 zum entsprechenden Ansatz pipettiert und die Zellen nach Ablauf der Stimulationsdauer auf Eis gesetzt, um den Fortlauf der Reaktion zu verhindern. Danach wurden die Zellen mit je 1 ml kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation 5 min, 280 x g, 4°C), um Kreuzreaktionen zu verhindern, und wieder in 100 µl warmem RPMI Medium resuspendiert. Es folgte die Stimulation mit 100 µl Antikörperlösung mit Anti-IgG/IgA/IgM. Die Stimulationsreaktion wurde gestoppt, indem pro Ansatz je 1 ml vorgewärmter 1x Fix/Lyse Puffer (BD, Heidelberg, Deutschland) zugegeben wurde. Die Fixierung erfolgte 10 min lang bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation 5 min, 500 x g, 4°C) und in je 250 µl Permeabilisationspuffer (Perm buffer II, BD) über Nacht bei -20°C oder 30 min auf Eis permeabilisiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit je 3 ml PBS/1%FCS (Zentrifugation 6 min, 500 x g, 4°C) erfolgte die Färbung der Zellen mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker und phosphorylierte Signalmoleküle 1 h bei

Raumtemperatur. Schließlich wurden die Zellen mit je 1 ml PBS/1%FCS gewaschen (Zentrifugation 5 min, 500 x g, 4°C) und am FACS Canto II (BD) analysiert.

### 2.9.2 Stimulation von KM-Zellen in Zellkultur

Mononukleäre Zellen aus Knochenmark wurden, wie unter 2.4.2 beschrieben, mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und je  $1 \times 10^6$  Zellen in 100 µl RPMI Komplet-Medium unter Zugabe von 1 µg/ml CXCL12, 500 ng/ml APRIL und 1 ng/ml IL6 in die Vertiefungen einer 96-Loch-Rundboden-Kulturplatte gefüllt. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen durch Zugabe von je 100 µl Antikörperlösung (siehe Tabelle 8) und Inkubation der Zellen bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> bis zur durchflusszytometrischen Analyse. In regelmäßigen Zeitabständen wurden die Well-Inhalte vollständig in FACS-Röhrchen überführt, die Zellen mit je 1 ml PBS gewaschen (Zentrifugation 5 min, 280 x g), mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker gefärbt und unter Zugabe von Dapi und einer fest definierten Menge an *countbright counting beads* (Invitrogen, Freiburg, Deutschland) am FACS Canto II (BD, Heidelberg, Deutschland) gemessen. Zusätzlich wurde eine intrazelluläre Färbung der Zellen zur Detektion des Proliferationsmarkers Ki67 durchgeführt. Die Analyse der Zellen erfolgte für jeden Stimulationsansatz jeweils in Duplikaten. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die ohne Stimulation bei gleichen Kulturbedingungen mitgeführt wurden.

Um in einem Folgeexperiment die Menge an *in vitro* sezernierten Immunglobulinen bestimmen zu können, wurden an Tag 2 nach Stimulation die Zellkulturüberstände der an diesem Tag zu messenden Zellen in Cryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

## 2.10 Reverse Transkription und quantitative *realtime* PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht eine selektive Anreicherung eines DNA-Fragments aus einem Gemisch linearisierter Nukleinsäuren. Bereits geringste Mengen an DNA sind dabei als Matrize ausreichend. Mittels quantitativer *realtime* PCR kann die genaue Kopienzahl einer Matrize in einer PCR-Reaktion ermittelt werden. Soll RNA als Matrize dienen, muss sie zuvor durch reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Um mehrere Proben miteinander vergleichen zu können, wird von jeder Probe exakt die gleiche Menge Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Von dieser Reaktion wird anschließend jeweils das gleiche Volumen in der quantitativen *realtime* PCR-Reaktion als Matrizen-DNA eingesetzt. Die PCR erfolgt mit Primern, die spezifisch für cDNAs ausgewählter Marker-Gene sind. Durch Amplifizierung eines ubiquitär exprimierten Gens wird kontrolliert, ob in allen Ansätzen gleich viel RNA eingesetzt wurde.

Zunächst wurden CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, wie unter 2.5.5 beschrieben, sortiert, abzentrifugiert, die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Extraktion von Gesamt-RNA inklusive microRNA erfolgte mit dem miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Danach wurden jeweils gleiche RNA-Mengen der

einzelnen Proben unter Verwendung des TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kits und Primern der TaqMan MicroRNA Assays für hsa-miR-26a und RNU6B (alles von Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gemäß des Herstellerprotokolls revers transkribiert, wobei RNU6B als endogene Kontrolle mitgeführt wurde. Hierfür wurden für jeden Ansatz folgende Reagenzien zusammengestellt:

RNA	2 µl
5x RT Primer	3 µl
dNTPs (100mM)	0,15 µl
MultiScribe Reverse Transkriptase (50U/µl)	1 µl
10x Reverse Transkription Puffer	1,5 µl
RNase Inhibitor (20U/µl)	0,19 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	<u>7,16 µl</u>
	15 µl

Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler „MyCycler“ (BioRad, München, Deutschland) in folgenden Schritten:

16°C	30 min
42°C	30 min
85°C	5 min
4°C	∞

Für die anschließende quantitative *realtime* PCR wurde der TaqMan Universal PCR Master Mix II (2x) ohne UNG und die TaqMan MicroRNA Assays für hsa-miR-26a und RNU6B (alles von Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Das Vorgehen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Für jeden Ansatz wurden folgende Reagenzien benutzt:

TaqMan MicroRNA Assay (20x)	1 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix II	10 µl
Produkt aus RT Reaktion	1,33 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	<u>7,67 µl</u>
	20 µl

Alle Ansätze wurden in Triplikaten ausgeführt und in eine PCR-Platte pipettiert. Für jedes angesetzte Primer-Paar wurde zusätzlich eine Wasserkontrolle (ohne cDNA) mitgeführt. Die Amplifizierung wurde im StepOnePlus Thermocycler (Applied Biosystems) in folgenden Schritten durchgeführt:

50°C	2 min	
95°C	10 min	
95°C	15 sec	} 40 Zyklen
60°C	60 sec	

Der Reaktionsverlauf sowie die Ergebnisse der Reaktion wurden anhand der StepOnePlus Software dokumentiert.

## 2.11 Genexpressionsanalyse mittels Microarray

Die Gewinnung der Proben sowie die Durchführung der Microarrays für eine Genexpressionsanalyse von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ erfolgte durch Dr. Henrik Mei in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Grützkau (DRFZ, Berlin). Zusammengefasst wurden CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>+</sup> KM PZ von vier KM-Proben, wie unter 2.5.5 beschrieben, isoliert und die Gesamt-RNA dieser Zellen isoliert, um anschließend Microarray-Analysen mittels des Affymetrix-Systems (Santa Clara, CA, USA) durchzuführen. Hierzu wurden 100 ng Gesamt-RNA von jeder Probe revers transkribiert, die cDNA biotinyliert, zweimal amplifiziert, fragmentiert und je 15 µg cRNA auf einen HU-U133A+ 2.0 GeneChip Array geladen, bei 45°C für 16 h unter Rotation in einem Hybridisierungssofen (640, Affymetrix) hybridisiert, gewaschen und mit Streptavidin-Phycoerythrin unter Verwendung der Affymetrix *GeneChip Fluidics Workstation 400* gefärbt. Abschließend wurden die insgesamt acht Arrays (vier Arrays für CD19<sup>+</sup> KM PZ sowie vier für CD19<sup>(-)</sup> KM PZ) in einem GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) mittels GCOS Software V1.4 (*GeneChip Operating Software*, Affymetrix) ausgelesen. Die so gewonnenen Daten der Microarrays lagen zu Beginn der Doktorarbeit bereits vor, so dass nur die anschließende Auswertung der Daten Bestandteil der vorliegenden Doktorarbeit war.

Die Reinheit der untersuchten Zellpopulationen konnte dadurch bestätigt werden, dass beide in der Genexpressionsanalyse untersuchten Zellpopulationen einen Plasmazell-typischen Phänotyp aufwiesen, d.h. hohe Signalstärken für *PRDM1*, *IRF4*, *CD138*, *CD38* und *CD27* sowie *absent calls* für Marker anderer Zelllinien, wie z. B. *CD3*, *CD14*, *CD34*, *ZAP70*, *FCGR1A* (CD64), *ITGA2B* (CD41), *ITGAM* (Mac-1), *IL3RA* (CD123) und *GYPA* (Glycophorin A). Zudem wurde die An- bzw. Abwesenheit des CD19-Transkripts in der entsprechenden Population bestätigt (Abb. 28 und Abb. 38).

Um herauszufinden, welche Gene in CD19<sup>+</sup> KM PZ versus CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant unterschiedlich exprimiert werden, wurden die GCOS-Daten der Microarrays, wie zuvor beschrieben (Mei et al., 2015; Menssen et al., 2009; Smiljanovic et al., 2010), unter Verwendung der BioRetis-Datenbank ([www.bioretis-analysis.de](http://www.bioretis-analysis.de)) einer HPCDA-Analyse (*High Performance Chip Data Analysis*, unpubliziert) unterzogen. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Joachim Grün (DRFZ, Berlin). Hierbei wurden voreingestellte Parameter genutzt, um hoch- bzw. herunterregulierte Gene zu identifizieren. Die Microarrays wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers einer Qualitätskontrolle unterzogen und normalisiert. Alle vier Chips der Gruppe 1 (CD19<sup>(-)</sup> KM PZ) wurden mit den vier Chips der Gruppe 2 (CD19<sup>+</sup> KM PZ) verglichen sowie alle Chips einer Gruppe untereinander in beide Richtungen. Folgende Parameter der absoluten und vergleichenden Analyse sind in der BioRetis-Datenbank enthalten: Signalstärke sowie Median, Mittelwert und Standardabweichung der Signalstärken in beiden Gruppen, An- oder Abwesenheit



der Transkripte (*present call*, P; *marginal call*, M; *absent call*, A), SLR (*signal log ratio*) und FC (*fold change*), sowie Signifikanz der differentiellen Expression (*Change Call: Increase*, I; *Marginal Increase*, MI; *Decrease*, D; *Marginal Decrease*, MD, *No Change*, NC) und der zugehörige p-Wert. Zusätzlich waren t-Tests der Signalstärken und SLRs in der Datenbank enthalten. Für jedes vorhandene Transkript wurde die Signifikanz der differentiellen Expression zwischen den beiden Array-Gruppen entweder durch Bonferroni-korrigierte Welch-Tests zwischen 16 SLRs aus Gruppe 1 versus Gruppe 2 und 24 SLRs innerhalb beider Gruppen in beide Richtungen ermittelt, oder durch mehr als 50% der nicht-parametrisch berechneten *Change Calls* aus dem Vergleich von Gruppe 1 versus Gruppe 2, d.h. wenn mindestens neun der 16 *Change calls* in derselben Richtung lagen. Signifikant differentiell exprimierte Gene wurden in der BioRetis-Datenbank nach voreingestellten Parametern filtriert. Diese Filter-Kriterien wurden anhand verschiedener Datensätze aus GeneChips entwickelt und mit dem Affymetrix LatinSquare Datensatz validiert (Menssen et al., 2009).

Eine anschließende Identifikation signifikant differentieller funktioneller Gruppen erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit mit Joachim Grün unter Verwendung von DAVID Bioinformatics Resources (Huang da et al., 2009a, b), um zu untersuchen, ob die zuvor in der HPCDA-Analyse ermittelten signifikant unterschiedlich exprimierten Gene in CD19<sup>+</sup> KM PZ versus CD19<sup>(-)</sup> KM PZ einer oder mehreren biologischen Funktionen zugeordnet werden können. Hierbei wurden die Gene anhand ihrer in Datenbanken hinterlegten bekannten Funktion(en) in Gruppen zusammengefasst, welche wiederum hinsichtlich ihrer funktionellen Gemeinsamkeiten einem bestimmten molekularen oder zellulären Prozess zugeordnet werden können. Je nach Anzahl und Relevanz der in einer Gruppe enthaltenen Gene wird ein Anreicherungswert (engl. *enrichment score*, ES) gebildet, welcher als Maß für die Signifikanz der funktionellen Gruppe angesehen werden kann. Ein ES > 2 bedeutet hierbei, dass die differentiell exprimierten Gene der untersuchten Zellpopulationen in der entsprechenden funktionellen Gruppe signifikant angehäuft erscheinen.

Da es auch möglich ist, dass einzelne Gene nur geringe Unterschiede der Transkriptionswerte aufweisen, die im paarweisen Vergleich keine Signifikanz bilden, diese schwachen Abweichungen jedoch in einer funktionellen Gengruppe zusammengekommen eine bedeutende Auswirkung auf biologische Funktionen haben können, erfolgte als zusätzliche Variante der Datenauswertung eine Analyse mit dem GSEA-Programm (*gene set enrichment analysis*, Broad Institute, MIT, Cambridge, MA, USA). Hier wird eine „hierarchisch angeordnete Genliste [...] systematisch auf die Verteilung von Komponenten bestimmter Gengruppen getestet. Sie beurteilt, ob ganze Gengruppen statistisch signifikant in einer einzelnen Kondition stärker oder schwächer transkribiert vorliegen [...] Die Gengruppen für eine solche Analyse definieren sich z. B. über eine molekulare Funktion, eine funktionelle Abhängigkeit oder eine gemeinsame Regulation.“ (Seifert, 2009, S. 37f.) Da einer GSEA-Analyse die Rohwerte der Signalstärken aus einer Genexpressionsanalyse zugrunde liegen, konnte hier der komplette Datensatz aus >54.000 Affymetrix-Gensonden mit den jeweiligen Signalstärken aller vier Donoren für jeweils CD19<sup>+</sup> und

CD19<sup>(-)</sup> KM PZ heran gezogen und eine Beschränkung auf bereits identifizierte signifikant differenziell exprimierte Gene vermieden werden. Die statistische Auswertung einer GSEA-Analyse basiert auf einer kumulativen Statistik, einem Gengruppen-basierenden *bootstrapping*-Verfahren und einer Anpassung des Multiplen-Test-Verfahrens (Subramanian et al., 2005).

## 2.12 MicroRNA-Expressionsanalyse

Eine microRNA (miRNA)-Expressionsanalyse erfolgte in Kooperation mit der Firma Vertis Biotechnologie AG (Freising, Deutschland). Hierfür wurden CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier KM-Proben, wie unter 2.5.5 beschrieben, sortiert, abzentrifugiert, die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C zwischengelagert. Anschließend wurden die Proben auf Trockeneis an Vertis für weitere Untersuchungen übergeben. Dort erfolgte die microRNA-Expressionsanalyse mittels *deep sequencing*, einem Hochdurchsatzverfahren, bei dem das gesamte miRNome der Proben identifiziert und quantifiziert werden kann. Zusammengefasst wurde zunächst die kleine RNA aus den Zellpellets isoliert und auf einem 15% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. RNA-Fractionen mit einer Länge von 19-29 Basen wurden anschließend durch Elektro-Elution aus dem Gel extrahiert, in Ethanol gefällt und in Wasser gelöst. Danach folgte die Umschreibung der miRNA in cDNA, wobei für jede Probe ein spezifischer Barcode angehängt wurde, um die Proben später unterscheiden zu können, und die Amplifizierung der cDNA-Produkte mittels PCR (Polymerasekettenreaktion). Anschließend wurde die cDNA gepoolt und mit dem Illumina Highseq 2000 System (Illumina, San Diego, CA, USA) sequenziert. Die so ermittelten miRNA-Sequenzen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Jürgen Wittmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hans-Martin Jäck (Abteilung für Molekulare Immunologie, Medizinische Klinik 3, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen) mit der Sequenzbibliothek für reife humane miRNAs von Sanger (miRBase, Ausgabe 16.0) unter Verwendung von miRanalyzer V2 (<http://bioinfo5.ugr.es/miRanalyzer/miRanalyzer.php>) verglichen, um die zu den Sequenzen gehörigen miRNAs zu ermitteln. Anhand der Anzahl der gemessenen Sequenzen konnte nun der prozentuale Anteil jeder miRNA in jeder Probe bestimmt werden.

## 2.13 Weitere verwendete Programme zur Analyse und Auswertung der Daten

Die Erfassung durchflusszytometrischer Daten am FACS Canto II erfolgte mittels der FACSDiva Software (BD, Heidelberg, Deutschland). Zur weiteren Auswertung und bildlichen Darstellung dieser Daten wurde FlowJo V7.6.4 (Tree Star, Ashland, OR, USA) verwendet. Datenberechnungen erfolgten mittels Microsoft Excel (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland). Graphische Darstellungen und statistische Auswertungen von Daten wurden, falls nicht anders angegeben, mit GraphPad Prism V5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) erstellt. Bei abhängigen

Grundgesamtheiten wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet, bei unabhängigen Grundgesamtheiten der Mann-Whitney-U-Test (beide doppelseitig mit 95 % Konfidenzintervall). Zur Untersuchung von Korrelationen wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient bestimmt.

### 3 ERGEBNISSE

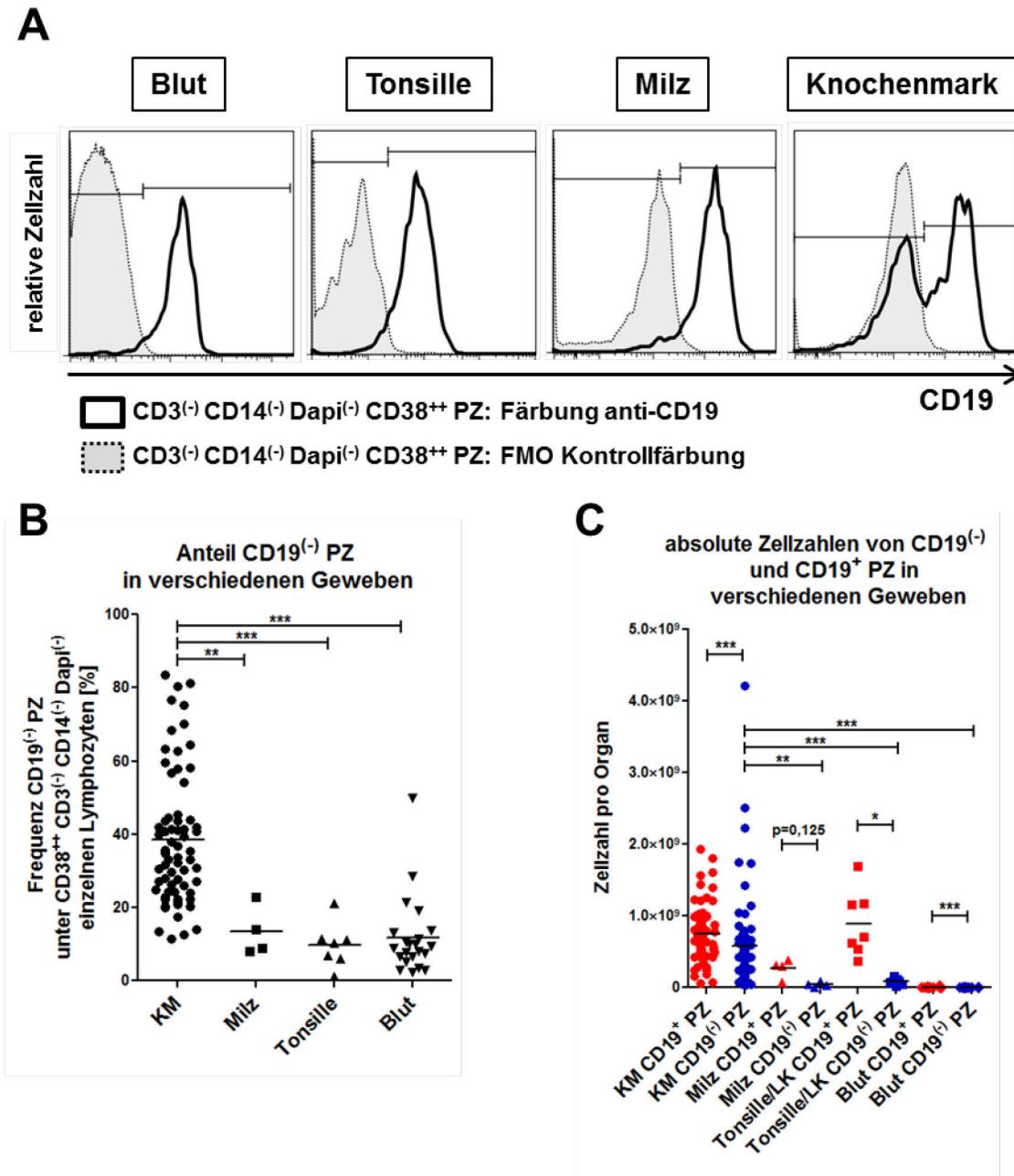
#### 3.1 Molekularbiologische Charakterisierung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> Knochenmark-Plasmazellen

Um einen initialen Eindruck über die phänotypischen Gemeinsamkeiten und Unterschiede von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> Knochenmark-Plasmazellen (KM PZ) zu gewinnen, wurden die beiden Zellpopulationen molekularbiologisch charakterisiert und verglichen. Die folgenden Kapitel befassen sich mit einer phänotypischen Beschreibung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und der Auswertung von Genexpressionsdaten, die einen ersten Hinweis auf mögliche funktionelle Eigenschaften dieser Zellen geben.

##### 3.1.1 Das menschliche Knochenmark ist Hauptspeicherort von CD19<sup>(-)</sup> Plasmazellen

Zunächst wurde überprüft, in welchen Geweben CD19<sup>(-)</sup> PZ detektiert werden können. Hierzu wurden mononukleäre Zellen aus KM, Tonsillen, Milzproben und peripherem Blut durchflusszytometrisch auf die absolute und relative Häufigkeit von CD19<sup>(-)</sup> PZ hin untersucht (Abb. 8A). Während in Tonsille, Milz und Blut fast alle detektierten PZ CD19 exprimierten (Durchschnitt Tonsille 90,3% ± 6,1%, Milz 86,6% ± 6,8%, Blut 88,2% ± 10,7%), fand sich im KM eine große Anzahl an CD19<sup>(-)</sup> PZ, die durchschnittlich 38,7% (± 18,2%) der gesamten KM PZ Population umfasste (Abb. 8B). Auch die Absolutzahlen, kalkuliert nach Trepel (1974) für Gesamt-Gewebe, verdeutlichen die Anreicherung von CD19<sup>(-)</sup> PZ im KM (Durchschnitt der Absolutzahlen: Milz  $4,6 \times 10^7 \pm 3,6 \times 10^7$  CD19<sup>(-)</sup> PZ versus  $2,7 \times 10^8 \pm 1,3 \times 10^8$  CD19<sup>+</sup> PZ; Tonsille  $8,2 \times 10^7 \pm 4,8 \times 10^7$  CD19<sup>(-)</sup> PZ versus  $8,9 \times 10^8 \pm 4,7 \times 10^8$  CD19<sup>+</sup> PZ; Blut  $5,2 \times 10^5 \pm 3,7 \times 10^5$  CD19<sup>(-)</sup> PZ versus  $6,5 \times 10^6 \pm 5,8 \times 10^6$  CD19<sup>+</sup> PZ; KM  $5,8 \times 10^8 \pm 6,6 \times 10^8$  CD19<sup>(-)</sup> PZ versus  $7,4 \times 10^8 \pm 4,0 \times 10^8$  CD19<sup>+</sup> PZ) (Abb. 8C).

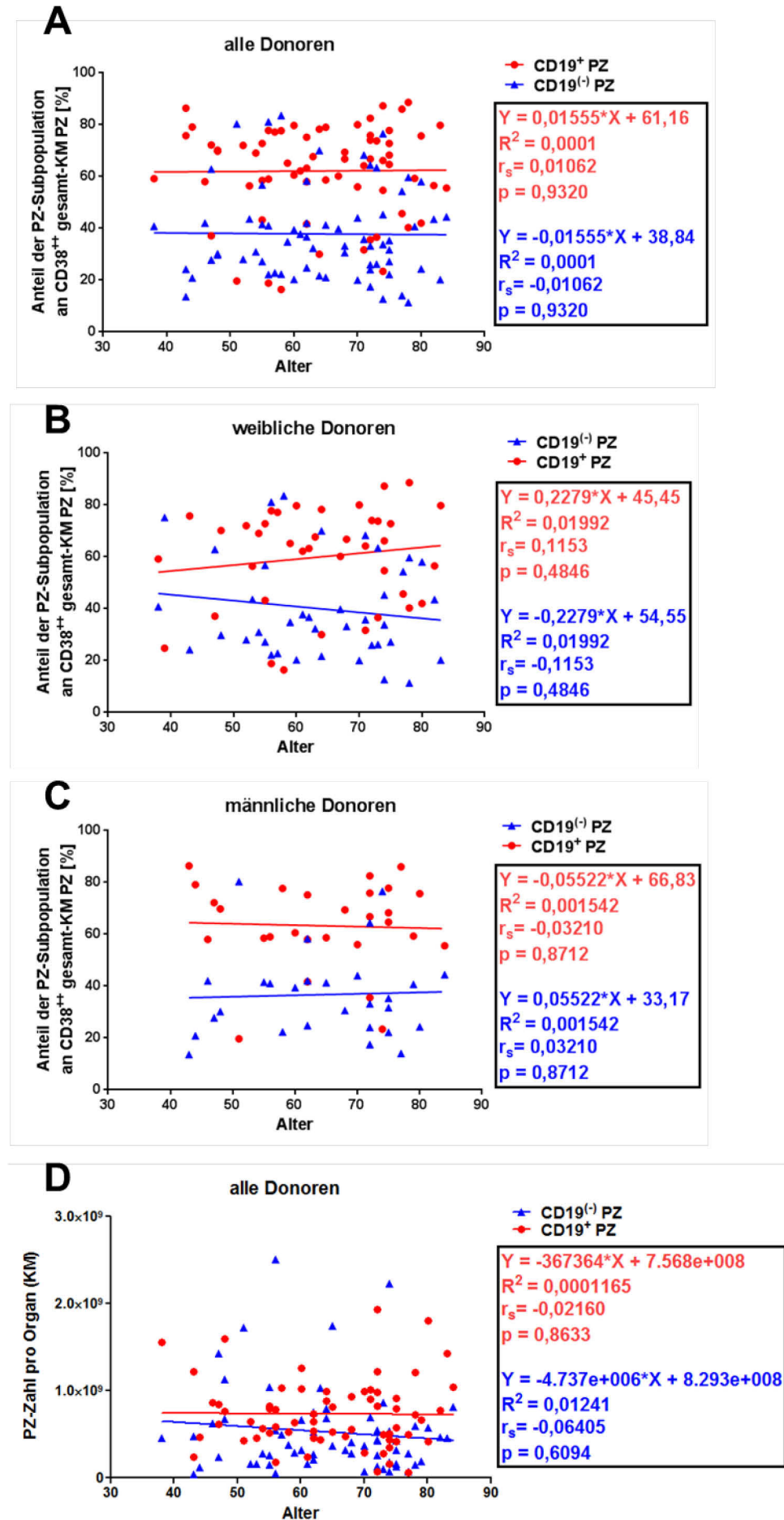
Sowohl die prozentuale Verteilung als auch die Absolutzahlen der CD19<sup>(-)</sup> PZ in den untersuchten Geweben zeigen, dass das menschliche KM als Hauptreservoir von CD19<sup>(-)</sup> PZ angesehen werden kann. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Hauptaugenmerk für nachfolgende Untersuchungen zu CD19<sup>(-)</sup> PZ auf das humane KM gerichtet.



**Abb. 8: Das menschliche Knochenmark (KM) ist der Hauptspeicherort von CD19<sup>(-)</sup> PZ.** Mononukleäre Zellen aus 67 KM-Proben, 4 Milzproben, 7 Tonsillen und 22 Blutproben wurden isoliert und die CD19-Expression von PZ wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben durchflusszytometrisch analysiert. A) Dargestellt sind exemplarische Histogramme der CD19-Färbung (schwarze Linie) bzw. der zugehörigen FMO-Kontrolle (grau schattierte Kurve) auf CD38<sup>++</sup> PZ in den verschiedenen Geweben. Die Grenzen für CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> PZ sind jeweils anhand horizontaler Balken festgesetzt. B, C) Graphische Darstellung des prozentualen Anteils an CD19<sup>(-)</sup> PZ (B) und der absoluten Zellzahl beider PZ-Populationen (C, blau CD19<sup>(-)</sup> PZ, rot CD19<sup>+</sup> PZ) in verschiedenen Geweben. Für jedes Gewebe ist jeweils der Mittelwert aus allen gemessenen Proben angegeben sowie die Signifikanzen aus dem Vergleich verschiedener Gewebe (Mann-Whitney-U-Test) bzw. gleicher Gewebe (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001). Die Absolutzahlen wurden nach Trepel (1974) kalkuliert.

### **3.1.2 Zusammenhang zwischen Alter und Geschlecht und der prozentualen Verteilung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ**

Da ein Großteil der verfügbaren KM-Proben von älteren Patienten stammt, wurde untersucht, ob Faktoren wie Alter oder Geschlecht der Patienten einen Einfluss auf den Umfang der CD19<sup>+</sup> KM PZ bzw. CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Population haben. Die durchflusszytometrische Analyse von insgesamt 67 KM-Proben ermittelte eine vergleichbare prozentuale Verteilung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> PZ im KM über eine Altersspanne von 36 bis 86 Jahren (Abb. 9A). Auch eine Unterteilung der Proben in weibliche und männliche Donoren zeigte keine signifikante Korrelation des Anteils an CD19<sup>(-)</sup> KM PZ mit dem Alter (Abb. 9B, C). Eine Berechnung der Absolutzahlen pro Gesamt-KM wies ebenfalls keine signifikante Korrelation mit dem Alter der Patienten auf, wenngleich tendenziell eine leichte Reduktion der Gesamtzahl sowohl von CD19<sup>+</sup> KM PZ als auch von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ mit zunehmendem Alter festgestellt werden konnte (Abb. 9D). Die für die Analysen ermittelten Regressionsgeraden besitzen keine oder eine nur sehr geringe Steigung, was dem Fehlen einer Korrelation der beiden untersuchten Merkmale entspricht. Die Bestimmtheitsmaße  $R^2$  der Regressionsgeraden liegen entsprechend bei 0,0 und weisen ebenfalls darauf hin, dass zwischen dem Alter der Patienten und dem Anteil an CD19<sup>(-)</sup> KM PZ kein linearer Zusammenhang besteht. Auch der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$  liegt für die untersuchten Merkmale im Bereich von 0,0 bis  $\pm 0,1$  und bekräftigt gemeinsam mit den hohen p-Werten ( $>0,05$ ), dass ein Zusammenhang zwischen Alter und Geschlecht und der prozentualen Verteilung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nicht bestätigt werden konnte.

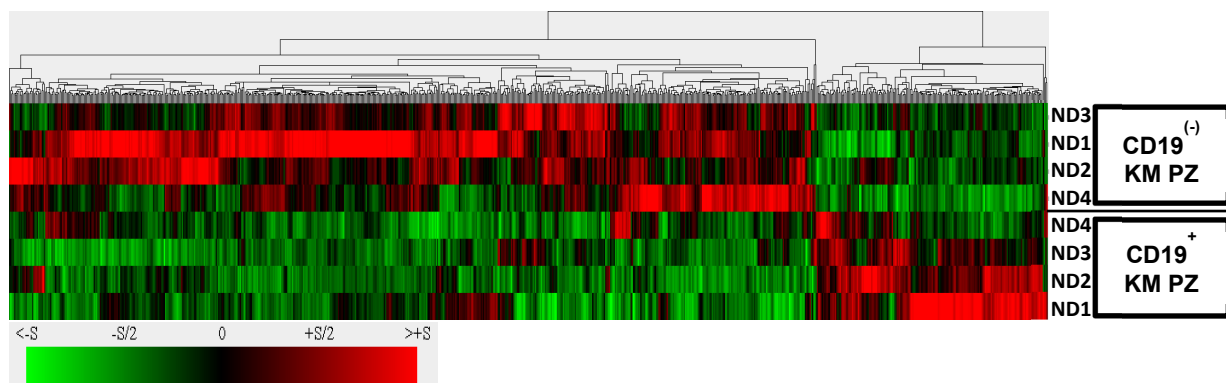


**Abb. 9 (umseitig): Die prozentuale Verteilung und Anzahl von CD19<sup>+</sup> KM PZ und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ korrelieren nicht mit dem Alter der Donoren.** Mononukleäre Zellen aus KM wurden isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD19<sup>+</sup> KM PZ (rot) und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ (blau) unter CD38<sup>++</sup> Gesamt-KM PZ bei allen gemessenen Donoren (A, n=67), bei weiblichen Donoren (B, n=39) und männlichen Donoren (C, n=28) sowie die nach Trepel (1974) kalkulierte Gesamt-Zellzahl von CD19<sup>+</sup> KM PZ und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ bei allen Donoren (D, n=67). Zusätzlich sind für jeden Graphen die Gleichung der Regressionsgerade, das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der Regressionsgerade, der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $r_s$  und der p-Wert der Korrelation angegeben.

### 3.1.3 Genexpressionsanalyse von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ

#### 3.1.3.1 Affymetrix-Genexpressionsanalyse ermittelt 689 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene zwischen CD19<sup>+</sup> KM PZ versus CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.

Eine weitere Möglichkeit, Unterschiede und Gemeinsamkeiten verschiedener Zellpopulationen in molekularbiologischer Hinsicht umfassend zu studieren, besteht in der Durchführung einer Genexpressionsanalyse mittels Microarray. Die Expression mehrerer tausend Gene kann auf diese Weise gleichzeitig analysiert werden, wodurch Hinweise auf die Funktionalität bzw. den Funktionszustand der Zellen gewonnen werden können. Neben einer qualitativen Aussage über das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Transkripten (*present call* bzw. *absent call*) ermöglicht die quantitative Analyse der in den Zellen vorhandenen mRNA-Transkripte eine vergleichende Aussage über Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Zellpopulationen.



**Abb. 10: Heatmap einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.** CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren (ND1-4) wurden mittels kombiniertem MACS/FACS-Verfahren isoliert und einer allgemeinen Genexpressionsanalyse unterzogen (2.11). Eine HPCDA (*high performance chip data analysis*)-Untersuchung ergab nach Bonferroni-Korrektur insgesamt 859 differenziell exprimierte Affymetrix-Gensonden (IDs), die 689 verschiedenen Genen entsprechen. Davon werden 668 IDs in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ stärker exprimiert als in CD19<sup>+</sup> KM PZ, 191 IDs sind in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ herunterreguliert. Unten: Farblegende für den Expressionsfaktor. Hochregulierte IDs sind rot, herunterregulierte IDs sind grün dargestellt. Die Erstellung der *heatmap* erfolgte mit Genes@Work (Califano et al., 2000).

Um solche Expressionsunterschiede auch in CD19<sup>+</sup> KM PZ versus CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zu identifizieren, wurden durch Dr. Henrik Mei (Arbeitsgruppe Prof. Thomas Dörner, Charité, Berlin) in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Grützkau (DRFZ, Berlin) die beiden KM PZ Fraktionen aus vier KM-Proben isoliert und ihre Gesamt-RNA einer



Genexpressionsanalyse mit Hilfe der Affymetrix Plattform unterzogen. Die daraus gewonnenen Ergebnisse wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit in Kooperation mit Dr. Joachim Grün (DRFZ, Berlin) mit der BioRetis-Datenbank ([www.bioretis-analysis.de](http://www.bioretis-analysis.de)) analysiert (siehe 2.11) (Menssen et al., 2009).

Insgesamt waren 859 Affymetrix-Gensonden in CD19<sup>(-)</sup> versus CD19<sup>+</sup> KM PZ signifikant unterschiedlich exprimiert, was einer Anzahl von 689 Genen entspricht. Dabei waren 668 Gensonden in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ stärker exprimiert als in CD19<sup>+</sup> KM PZ, während 191 Gensonden in CD19<sup>+</sup> KM PZ eine signifikant höhere Signalstärke aufwiesen (Abb. 10). Die große Anzahl differenziell exprimierter Gene in CD19<sup>+</sup> versus CD19<sup>(-)</sup> KM PZ spricht für die Verschiedenartigkeit dieser beiden Populationen und weist darauf hin, dass sie sich nicht nur anhand der unterschiedlichen Expression eines Oberflächenmarkers, nämlich CD19, voneinander abgrenzen lassen, sondern möglicherweise auch individuelle funktionelle Rollen für die Aufrechterhaltung der humoralen Immunität übernehmen könnten.

Um einen Überblick zu erhalten, welche Gene in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ differenziell exprimiert werden, wurden die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Genen gefiltert, welche eine bekannte Funktion in der B-Zell- und PZ-Biologie ausüben, z. B. in Bezug auf Zelldifferenzierung und -reifung, Regulation von Apoptose und Überleben, Aktivierung, Proliferation sowie Migration und Adhäsion. Unter den Genen, die in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant verstärkt exprimiert werden, fanden sich Transkripte der MHC-I-Moleküle (HLA-A, HLA-B und HLA-C), während MHC-II-Moleküle (HLA-DR, HLA-DM) auf CD19<sup>+</sup> KM PZ stärker exprimiert wurden. GAS2, welches Prozesse wie Zellzyklus und Apoptose reguliert und in Tumorzellen hochreguliert sein kann (Zhou et al., 2014), war in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant stärker exprimiert, ebenso wie das Adhäsionsmolekül NCAM1 (CD56), welches auch auf CD19<sup>(-)</sup> Myelomzellen detektiert werden kann (Kawano et al., 1995; Pellat-Deceunynck et al., 1994). Das Transkript des in KM PZ antiapoptotisch wirkenden Oberflächenproteins CD28 und der antiapoptotischen Moleküle Bcl2 und Mcl1 waren ebenfalls in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant stärker exprimiert als in CD19<sup>+</sup> KM PZ. Zudem wiesen CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant stärkere Expression einiger weiterer Adhäsionsmoleküle auf, die v. a. in der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten eine Rolle spielen, so etwa TJP1, PKP2, DST und DSG2 (Furuse et al., 1994; Hofmann et al., 2000; Hopkinson und Jones, 2000; Itoh et al., 1997; Steinberg et al., 1987). Auch PERP, dessen Funktion ursprünglich als Zielgen des Tumorsuppressors p53 in der Regulierung der Apoptose identifiziert wurde (Attardi et al., 2000), jedoch nach neuen Erkenntnissen auch eine entscheidende Rolle in der Ausprägung desmosomaler Zell-Zell-Kontakte spielt (Beaudry et al., 2010; Ihrle et al., 2005), war in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant stärker exprimiert als in CD19<sup>+</sup> KM PZ (Tabelle 9). Eine Auflistung aller differenziell unterschiedlich exprimierten Gene befindet sich im Anhang.

**Tabelle 9: Auswahl einiger in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ versus CD19<sup>+</sup> KM PZ signifikant differenziell exprimierten Gene.** Die Genexpressionsdaten von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden in Kooperation mit Dr. Joachim Grün (DRFZ, Berlin) mit der BioRetis-Datenbank ([www.bioretis-analysis.de](http://www.bioretis-analysis.de)) analysiert und nach Bonferroni-Korrektur einer HPCDA-Analyse unterzogen (2.11). Der daraus entstehende HPCDA-Wert kann als Maß für die Signifikanz der Analyse angesehen werden. Ein positiver *fold change* (FC) bedeutet stärkere Expression in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, ein negativer FC entspricht stärkerer Expression in CD19<sup>+</sup> KM PZ.

Affymetrix ID	Gensymbol	Bezeichnung	FC	HPCDA
205848_at	GAS2	growth arrest-specific 2	4,81905	1922,10
217901_at	DSG2	Desmoglein 2	7,17884	1563,98
215193_x_at	HLA-DRB1 /// HLA- DRB3	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	-3,1794	1472,82
222392_x_at	PERP	PERP, TP53 apoptosis effector	1,69643	1321,02
212254_s_at	DST	dystonin	2,47298	1189,68
202011_at	TJP1	tight junction protein 1 (zona occludens 1)	3,89737	957,13
208729_x_at	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	1,61748	897,67
207717_s_at	PKP2	plakophilin 2	9,72198	664,30
212843_at	NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	8,53712	638,88
217478_s_at	HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	-1,842	538,40
206545_at	CD28	CD28 antigen (Tp44)	3,29151	494,18
206398_s_at	CD19	CD19 antigen	-11,866	443,01
201029_s_at	CD99	CD99 antigen	-1,6818	439,33
215313_x_at	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A	1,37197	397,60
211799_x_at	HLA-C	Major histocompatibility complex, class I, C	1,66008	325,51
201005_at	CD9	CD9 antigen (p24)	1,5897	268,21
204563_at	SELL	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)	-1,7336	232,27
232210_at	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	1,94026	221,90
212588_at	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	-1,6745	211,69
241722_x_at	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2- related)	1,54221	193,67
210889_s_at	FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	-1,4641	187,73

Um Verunreinigungen durch andere Zellpopulationen auszuschließen, wurde überprüft, ob die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse die Reinheit von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ widerspiegeln. Dabei konnte festgestellt werden, dass das Transkript von CD19 wie erwartet nur in der CD19<sup>+</sup> KM PZ Fraktion zu finden war, während CD19<sup>(-)</sup> KM PZ keine CD19-mRNA aufwies. Bekannte PZ-Marker wie CD27, CD38 und CD138 sowie XBP1, IRF4 und PRDM1 (welches Blimp-1 kodiert) waren in beiden PZ-Populationen stark exprimiert, ohne signifikante Unterschiede zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. Umgekehrt waren Transkripte von Markern anderer Zelllinien, wie z. B. CD3 und Zap70 für T-Zellen, CD14 für Monozyten und Makrophagen, CD11c für dendritische Zellen, CD34 für Endothelzellen, CD66b für

Granulozyten oder GYPA für Erythrozyten, kaum oder gar nicht vorhanden (Abb. 38, Anhang).

### 3.1.3.2 Identifikation signifikant differenzieller funktioneller Gruppen mittels DAVID Bioinformatics Resources

Um herauszufinden, welche mögliche funktionelle Bedeutung die unterschiedliche Expression der in 3.1.3.1 erwähnten 689 Gene für CD19<sup>+</sup> bzw. CD19<sup>(-)</sup> KM PZ haben könnte, wurden diese Gene mit Hilfe der Analysesoftware von DAVID Bioinformatics Resources (Huang da et al., 2009a, b) in Zusammenarbeit mit Dr. Joachim Grün (DRFZ, Berlin) in funktionelle Gruppen eingeteilt (sogenanntes *Functional Annotation Clustering*). Hierbei werden Gene anhand ihrer in Datenbanken hinterlegten bekannten Funktion(en) in Gruppen zusammengefasst, welche wiederum hinsichtlich ihrer funktionellen Gemeinsamkeiten zugeordnet werden können. Dabei wird je nach Anzahl und Relevanz der in einer Gruppe enthaltenen Gene ein Anreicherungswert (engl. *enrichment score*, ES) gebildet, welcher als Maß für die Signifikanz der funktionellen Gruppe angesehen werden kann. Ein ES > 2 bedeutet hierbei, dass die differenziell exprimierten Gene der untersuchten Zellpopulationen in der entsprechenden funktionellen Gruppe signifikant angehäuft erscheinen. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse aus dem *Functional Annotation Clustering* der in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ versus CD19<sup>+</sup> KM PZ signifikant differenziell exprimierten Gene. Dargestellt sind alle funktionellen Gruppen mit einem ES > 2.

**Tabelle 10: Zusammenfassung signifikant differenziell exprimierter Gene in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ versus CD19<sup>+</sup> KM PZ in funktionellen Gruppen mittels DAVID Bioinformatics Resources (Huang da et al., 2009a, b). ES, *enrichment score*.**

Funktionelle Gruppe	Bezeichnung	ES
1	Bindung von Enzymen und Kinasen	5,16
2	Isopeptidbindung, Ubiquitinylierung	4,89
3	Immunantwort, MHC Klassen	4,14
4	Golgi Apparat	3,47
5	Modifikation/Phosphorylierung von Peptidyl-Serin oder Peptidyl-Threonin	3,33
6	Apoptose	3,26
7	Zellbewegung und –migration	2,53
8	Mannosidase-Aktivität	2,47
9	Protein-Modifikation und –Phosphorylierung	2,42
10	nuclear bodies	2,20
11	Zellaktivierung, B-Zell-Differenzierung	2,18
12	Signalweg von Transmembran-Rezeptor Serin/Threonin Kinasen, TGFβ-Rezeptor/SMAD-Signalweg	2,10

Es stellte sich heraus, dass zelluläre Prozesse, die in Plasmablasten und Plasmazellen sowie deren Vorläuferstufen eine wichtige Rolle spielen, sich auch in

dieser Analyse deutlich abzeichnen, wie z. B. Differenzierung, Migration und Immunantwort, aber auch die Überlebensfähigkeit bzw. Apoptose von Zellen. Zudem scheint auch die Modifikation bzw. Phosphorylierung von Proteinen z. B. im Rahmen verschiedener Signalwege in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine unterschiedliche Rolle zu spielen. Abgesehen vom TGFβ-Signalweg konnten diese Unterschiede hier jedoch keinem bestimmten Signalweg zugeordnet werden, sondern finden sich in einer Vielzahl zellulärer Prozesse wieder, sodass allein anhand dieser Analyse keine hinreichende Aussage über eine möglicherweise verstärkte oder abgeschwächte Ausprägung bestimmter Signalwege in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ getroffen werden kann.

Während die Identifikation funktioneller Gruppen mittels DAVID Bioinformatics Resources sich nur auf die signifikant differenziell exprimierten Gene in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ beschränkt, stellte sich auch die Frage nach der qualitativen An- bzw. Abwesenheit bestimmter Transkripte in diesen beiden PZ-Populationen, unabhängig davon, ob das entsprechende Gen unterschiedlich exprimiert wird oder nicht. Eine umfassende Analyse des Transkriptoms reifer PZ im KM gesunder Probanden könnte somit einen tieferen Einblick in Biologie und zelluläre Prozesse von KM PZ liefern. Im Anhang befindet sich ein Überblick über An- bzw. Abwesenheit bestimmter Gentranskripte sowie deren Expressionsstärke in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, zusammengefasst in Gruppen, die entweder aufgrund ihrer für PZ oder Immunzellen allgemein relevanten Funktion oder basierend auf den Ergebnissen des *Functional Annotation Clustering* ausgewählt wurden. Die Gengruppen wurden hierbei anhand der verfügbaren Primärliteratur zusammengestellt (siehe Anhang, S. 163).

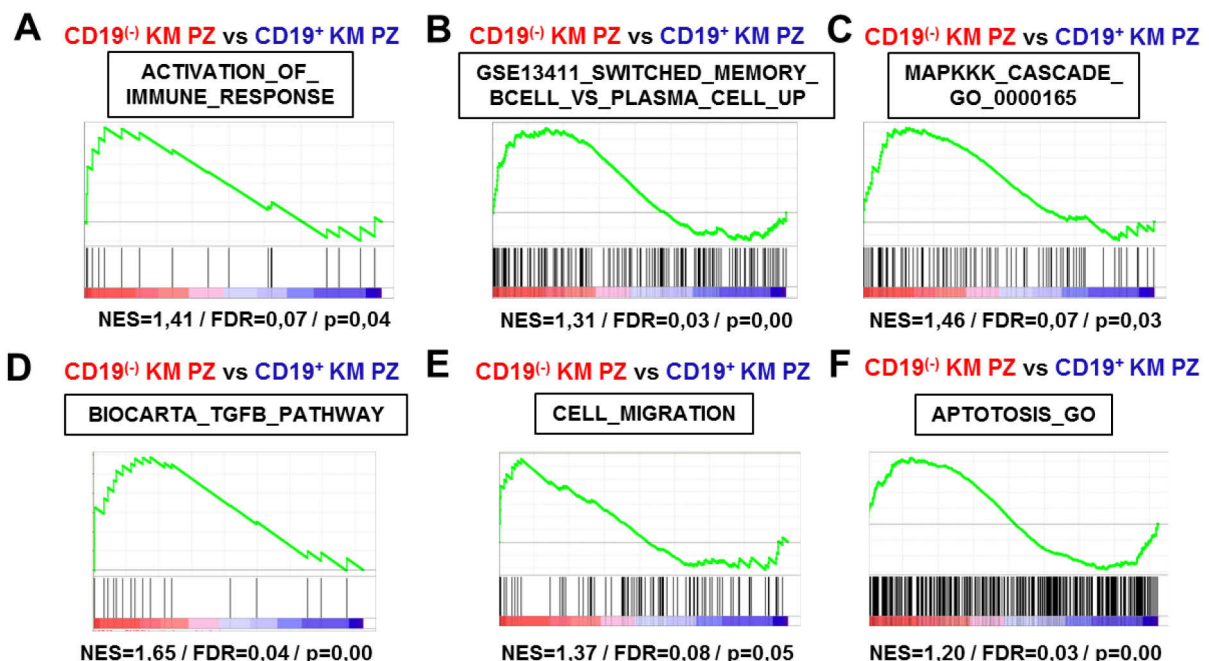
### 3.1.3.3 GSEA-Analyse

Um die Relevanz der in 3.1.3.1 und 3.1.3.2 beschriebenen Ergebnisse zu prüfen, wurde zusätzlich ein weiteres Verfahren gewählt, mit dem Resultate einer Genexpressionsanalyse beurteilt werden können.

Ein etabliertes Programm zur statistischen Auswertung von Genexpressions-Datensätzen ist die GSEA-Analyse (*gene set enrichment analysis*). Ähnlich wie im unter 3.1.3.2 beschriebenen Verfahren testet sie Genlisten „systematisch auf die Verteilung von Komponenten bestimmter Gengruppen [und] [...] beurteilt, ob ganze Gengruppen statistisch signifikant in einer einzelnen Kondition stärker oder schwächer transkribiert vorliegen“ (Seifert, 2009, S. 37). Anders als bei DAVID Bioinformatics Resources liegen einem GSEA-Verfahren jedoch nicht die Bezeichnungen einzelner Gensonden, sondern die Rohwerte der Signalstärken aus einer Genexpressionsanalyse zugrunde, weshalb hier der komplette Datensatz aus >54.000 Affymetrix-Gensonden mit den jeweiligen Signalstärken aller vier Donoren für jeweils CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ herangezogen werden konnte und keine Beschränkung auf bereits identifizierte signifikant differenziell exprimierte Gene erfolgen musste. Die für die GSEA-Analyse verwendeten Gengruppen wurden unverändert aus der MSigDB (*Molecular Signatures Database*) (Liberzon et al., 2011) entnommen und anhand ihrer potenziellen Bedeutung für die PZ-Biologie oder

basierend auf den zuvor gewonnenen und unter 3.1.3.1 bzw. 3.1.3.2 beschriebenen Ergebnissen ausgewählt. Jede Analyse wurde 1000-fach permutiert und erhielt durch das GSEA-eigene Normalisierungs- und Rechnungsverfahren einen zugehörigen Anreicherungs-Spiegel (engl. *enrichment score*, ES).

Eine hohe Signifikanz für die Anreicherung einer Gengruppe in einer Kondition gilt bei einem normalisierten ES (NES) > 1,2, einer Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) < 0,05 und einer FDR (false discovery rate) < 0,25. Da auf nur wenige Gengruppen alle drei Kriterien gleichzeitig zutrafen (Abb. 11), ist in Tabelle 11 eine Auswahl von Gengruppen gelistet, die mindestens eines der Signifikanzkriterien erfüllen und somit als in einer Kondition (CD19<sup>-</sup> KM PZ oder CD19<sup>+</sup> KM PZ) angereichert angesehen werden können.



**Abb. 11: Auswahl signifikant angereicherter Gengruppen in CD19<sup>-</sup> KM PZ versus CD19<sup>+</sup> KM PZ.** Die durch Genexpressionsanalyse ermittelten Signalwerte in sortierten CD19<sup>+</sup> KM PZ und CD19<sup>-</sup> KM PZ wurden einer GSEA-Analyse (*gene set enrichment analysis*) für verschiedene Gengruppen unterzogen. „Der ES-Kurvenverlauf (grün) reflektiert die Gewichtung einer Verteilung der betrachteten Gengruppe entweder im positiven (rot) oder negativen Bereich (blau) eines paarweisen Vergleiches aus zwei Komponenten (siehe Farbkodierung in der Überschrift). Ein positiver ES („Berg“) stellt daher eine Gewichtung im roten, ein negativer ES („Tal“) eine Gewichtung im blauen Bereich eines paarweisen Vergleiches dar, gemessen an einer Null-Linie (schwarz). Einzelne Mitglieder einer Gengruppe sind dargestellt als senkrechte Striche (schwarz), relativ zu ihrer Position in der Rangliste exprimierter Gene“ (Seifert, 2009, S. 86). Die Gengruppen dieser Analyse wurden unverändert aus MSigDB (*Molecular Signatures Database*) (Liberzon et al., 2011) entnommen und sind jeweils unter ihren offiziellen Bezeichnungen angegeben. NES (*normalized enrichment score*), FDR (*false discovery rate*) und Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  sind jeder Analyse beigegefügt. A, C-F) Gengruppen aus GO. B) Gene, die in klassengewechselten Milz-Gedächtnis-B-Zellen hochreguliert sind, verglichen mit Plasmazellen aus der Milz (Good et al., 2009).

Die Tendenz der Ergebnisse aus dem *Functional Annotation Clustering* (3.1.3.2) konnte mit der GSEA-Analyse bestätigt werden. Auch hier zeigte sich eine Anreicherung von Genen, die in Zellmigration und –motilität sowie Adhäsion, Differenzierung und Apoptose eine Rolle spielen. Auch eine unterschiedliche

Gewichtung bestimmter Signalwege konnte festgestellt werden, in diesem Fall bei dem TGF $\beta$ -Signalweg und der MAPKKK-Kaskade. Diese Resultate sprechen abermals dafür, dass CD19<sup>(-)</sup> und CD19<sup>+</sup> KM PZ nicht nur anhand eines Oberflächenmarkers voneinander abgegrenzt werden können, sondern dass die beiden untersuchten Populationen auch funktionell unterscheidbar sind.

Zusammengefasst bieten sowohl die Analyse der differenziell signifikant exprimierten Gene als auch die GSEA-Analyse aller Gentranskripte in CD19<sup>+</sup> versus CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine Grundlage für spätere Untersuchungen, die auf die funktionellen Eigenschaften dieser PZ-Populationen und deren möglicherweise unterschiedliche Bedeutung für das humorale Immungedächtnis eingehen sollen (siehe Kapitel 3.2). Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf den Reifegrad und die Überlebensfähigkeit der beiden KM PZ Populationen gerichtet, um die eingangs gestellten Fragen nach der Herkunft und Langlebigkeit von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ im Vergleich zu CD19<sup>+</sup> KM PZ zu beantworten.

**Tabelle 11: Übersicht über GSEA-Analysen von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ versus CD19<sup>+</sup> KM PZ.** Die Gengruppen wurden unverändert aus MSigDB (*Molecular Signatures Database*) (Liberzon et al., 2011) entnommen. Angegeben sind die Ergebnisse derjenigen GSEA-Analysen, die mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllen: NES (*normalized enrichment score*) >1,2; FDR (*false discovery rate*) <0,25; Irrtumswahrscheinlichkeit p<0,05. Negative NES-Werte bedeuten eine Anreicherung der untersuchten Gene in CD19<sup>+</sup> KM PZ, positive NES-Werte weisen auf eine Gewichtung in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ hin.

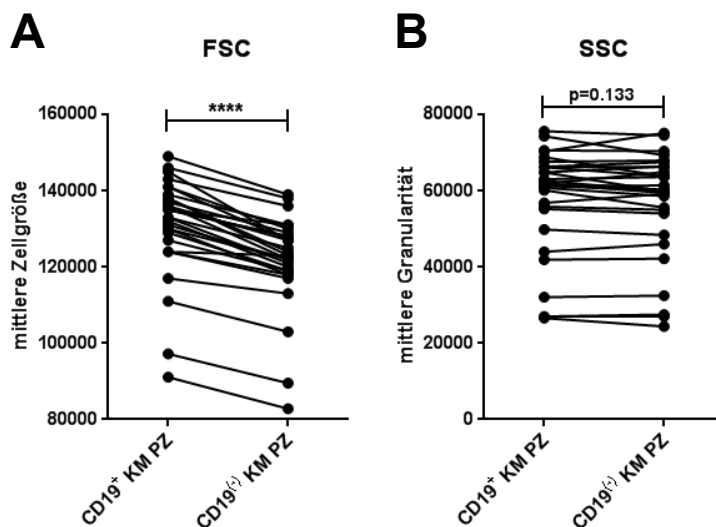
Name der Gengruppe	NES	FDR	p-Wert	Referenz
TARTE_PLASMA_CELL_VS_PLASMABLAST_UP	1,27	0,14	0,11	Tarte et al. (2003)
GSE10325_BCELL_VS_MYELOID_DN	1,27	0,10	0,08	Hutcheson et al. (2008)
GSE13411_PLASMA_CELL_VS_MEMORY_BCELL_UP	1,29	0,17	0,15	Good et al. (2009)
GSE13411_SWITCHED_MEMORY_BCELL_VS_PLASMA_CELL_DN	1,15	0,23	0,20	Good et al. (2009)
GSE13411_SWITCHED_MEMORY_BCELL_VS_PLASMA_CELL_UP	1,31	0,03	0,00	Good et al. (2009)
GSE22886_IGG_IGA_MEMORY_BCELL_VS_BM_PLASMA_CELL_DN	1,19	0,19	0,16	Abbas et al. (2005)
BIOCARTA_TGFB_PATHWAY	1,65	0,04	0,00	<a href="http://www.biocarta.com/pathfiles/PathwayProteinList.asp?showPFID=149">http://www.biocarta.com/pathfiles/PathwayProteinList.asp?showPFID=149</a>
MAPKKK_CASCADE_GO_0000165	1,46	0,07	0,03	GO:0000165
ACTIVATION_OF_IMMUNE_RESPONSE	1,41	0,07	0,04	GO:0002253
APOPTOSIS_GO	1,20	0,03	0,00	GO:0006915
CELL_CYCLE_ARREST_GO_0007050	1,39	0,08	0,07	GO:0007050
CELL_MIGRATION	1,37	0,08	0,05	GO:0016477
B_CELL_DIFFERENTIATION	1,32	0,20	0,16	GO:0030183
HUMORAL_IMMUNE_RESPONSE	1,33	0,11	0,07	GO:0006959
PROGRAMMED_CELL_DEATH	1,17	0,03	0,00	GO:0012501
REGULATION_OF_CELL_CELL_ADHESION	-1,28	0,15	0,13	GO:0022407

### 3.1.4 Phänotypische Charakterisierung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ mittels Durchflusszytometrie

Da die unter 3.1.3 beschriebenen Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ auf einer begrenzten Anzahl von Untersuchungen beruhen und Transkriptomdaten generell einer Verifizierung bedürfen, weil das bloße Vorhandensein der mRNA eines Gens nicht zwangsläufig bedeuten muss, dass dieses Transkript auch erfolgreich in ein Protein umgeschrieben wird, wurde die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle oder intrazellulärer Proteine in KM PZ zusätzlich durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei lag der Fokus vor allem auf Molekülen, die sich durch Betrachtung der funktionellen Gruppen der Anreicherungsanalysen als interessante Kandidaten herauskristallisiert hatten.

#### 3.1.4.1 Expression von B-Zell- und Plasmazell-Markern

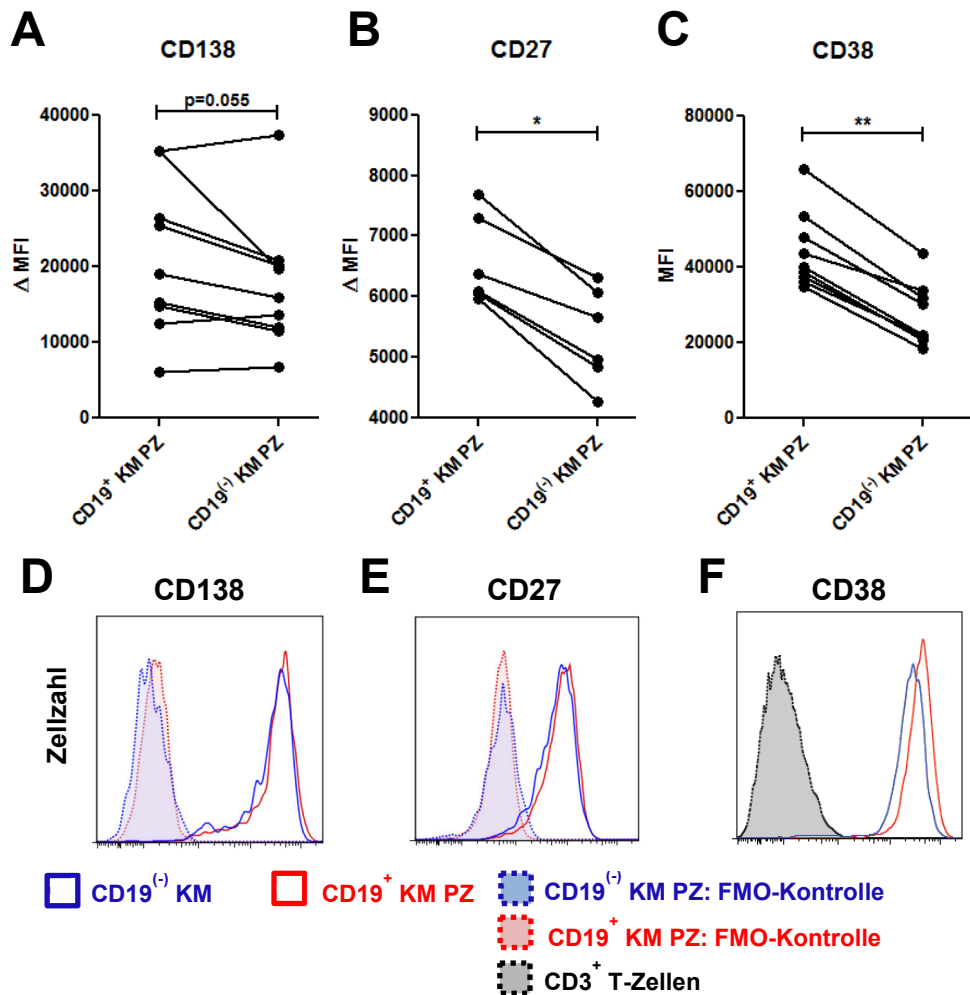
Weil einerseits die Daten der Genexpressionsanalyse Hinweise auf möglicherweise unterschiedliche Reifegrade bei CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ lieferten und um andererseits auch durchflusszytometrisch zu bestätigen, dass es sich bei den beiden untersuchten Zellpopulationen um PZ handelt, wurde die Expression typischer PZ-Marker auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> überprüft.



**Abb. 12: Vergleich der Größe und Granularität von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.** Mononukleäre Zellen aus KM wurden wie in Kapitel 2 beschrieben isoliert und mit Antikörpern gefärbt. KM PZ wurden als CD3<sup>(-)</sup> CD14<sup>(-)</sup> Dapi<sup>(-)</sup> CD38<sup>++</sup> Zellen eingegrenzt. Die durchflusszytometrische Analyse von KM PZ ergab für CD19<sup>+</sup> PZ einen signifikant höheren FSC (*forward scatter*, Vorwärtsstreulicht) als Maß für die Zellgröße verglichen mit CD19<sup>(-)</sup> PZ (A), während der SSC (*side scatter*, Seitwärtsstreulicht) als Maß für die Granularität der Zellen ähnliche Werte bei beiden PZ-Populationen annahm (B). n=30, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; \*\*\*\*, p<0,0001.

Zunächst wurden Eigenschaften wie Größe und Granularität von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ verglichen. Hierbei zeigte sich, dass das Vorwärtsstreulicht (FSC) als Maß für die Zellgröße bei CD19<sup>+</sup> KM PZ eine signifikant höhere Signalstärke aufwies als bei CD19<sup>(-)</sup> KM PZ (Abb. 12A), wobei beide PZ-Populationen zu den großen Lymphozyten gehören und sich anhand des Zelldurchmessers deutlich von kleineren B- oder T-Lymphozyten unterscheiden lassen. Die Granularität von CD19<sup>+</sup> und

CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, im Durchflusszytometer gemessen anhand des Signals des Seitwärtsstreulichts (SSC), war bei beiden PZ-Populationen ähnlich (Abb. 12B).

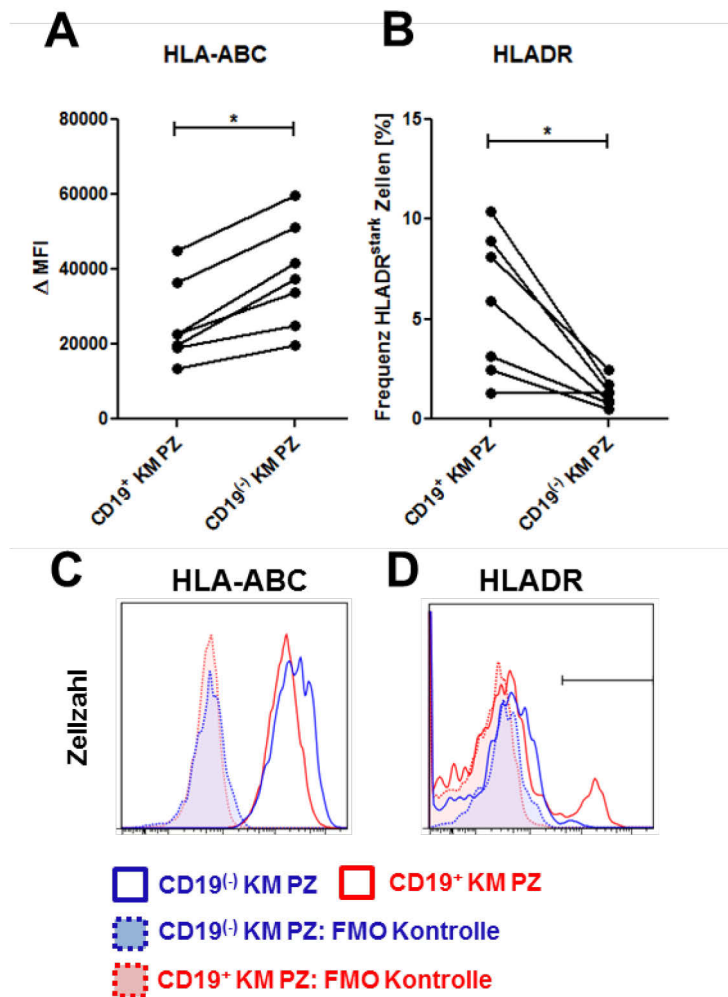


**Abb. 13: Durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von PZ-Markern auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.** Mononukleäre Zellen aus KM wurden wie in Kapitel 2 beschrieben isoliert und mit Antikörpern gefärbt. KM PZ wurden als CD3<sup>(-)</sup> CD14<sup>(-)</sup> Dapi<sup>(-)</sup> CD38<sup>++</sup> Zellen eingegrenzt. Während CD138 auf beiden PZ-Populationen in ähnlichem Maß exprimiert wird (A, D), werden sowohl CD27 (B, E) als auch CD38 (C, F) auf CD19<sup>+</sup> KM PZ signifikant stärker exprimiert als auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. Alle drei untersuchten PZ-Marker weisen dabei eine insgesamt hohe Expressionsstärke auf beiden PZ-Populationen auf. A-C) Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des untersuchten Markers bzw. die Differenz aus MFI des Markers und MFI einer zugehörigen FMO-Kontrolle (ΔMFI) aus mindestens sechs KM-Proben. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01. D-F) Exemplarische Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse. CD19<sup>(-)</sup> KM PZ sind als blaue durchgezogene Linie abgebildet, CD19<sup>+</sup> KM PZ als rote durchgezogene Linie. FMO-Kontrollen sind als schattierte, gestrichelte Linien in der zugehörigen Farbe dargestellt. Bei der Untersuchung von CD38 dienten CD3<sup>+</sup> T-Zellen als Negativkontrolle (schwarze, schattierte, gestrichelte Linie).

Des Weiteren wurde die Expression der typischen PZ-Marker CD138, CD38 und CD27 auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ überprüft. Während alle drei Marker auf beiden PZ-Populationen in hohem Maße detektierbar waren und sowohl CD19<sup>+</sup> als auch CD19<sup>(-)</sup> KM PZ neben ihrer Eigenschaft als Antikörper-sezernierende Zellen anhand dieser Marker eindeutig als PZ identifiziert werden konnten (Kaminski et al., 2012; Mei et al., 2007), wiesen CD19<sup>+</sup> KM PZ eine signifikant stärkere Expression der Aktivierungsmarker CD27 und CD38 auf als CD19<sup>(-)</sup> KM PZ (Abb. 13B, C, E, F). Die



Expression des Adhäsionsmoleküls CD138 zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden untersuchten KM PZ Populationen (Abb. 13A, D).



**Abb. 14: Durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von MHC-Molekülen auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.** Mononukleäre Zellen aus KM wurden wie in Kapitel 2 beschrieben isoliert und mit Antikörpern gefärbt. KM PZ wurden als CD3<sup>(-)</sup> CD14<sup>(-)</sup> Dapi<sup>(-)</sup> CD38<sup>++</sup> Zellen eingegrenzt. MHC-I-Moleküle, hier mit einem Anti-HLA-ABC-Antikörper detektiert, werden auf beiden PZ-Populationen stark exprimiert, wobei die Expression auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant höher ist als auf CD19<sup>+</sup> KM PZ (A, C). Das MHC-II-Molekül HLADR wird von beiden PZ-Populationen größtenteils nur in geringem Maße exprimiert, wobei eine HLADR<sup>stark</sup> exprimierende Fraktion innerhalb der CD19<sup>+</sup> KM PZ Population nachgewiesen werden konnte (B, D). A-B) Dargestellt ist die Differenz (ΔMFI) aus MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) von HLA-ABC und MFI einer zugehörigen FMO-Kontrolle (A) bzw. der prozentuale Anteil an HLADR<sup>stark</sup> exprimierenden Zellen (B) aus sieben KM-Proben. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; \*, p<0,05. C-D) Exemplarische Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse. CD19<sup>(-)</sup> KM PZ sind als blaue durchgezogene Linie abgebildet, CD19<sup>+</sup> KM PZ als rote durchgezogene Linie. FMO-Kontrollen sind als schattierte, gestrichelte Linien in der zugehörigen Farbe dargestellt. Die Eingrenzung von HLADR<sup>stark</sup> exprimierenden Zellen ist als schwarzer horizontaler Balken eingefügt.

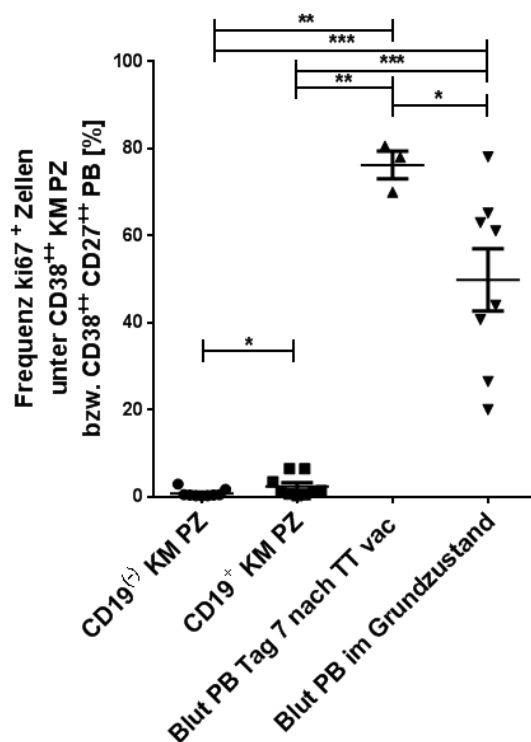
Eine Analyse der Expression von MHC-Molekülen zeigte, dass die MHC-I-Komplexe HLA-ABC auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant stärker exprimiert werden als auf CD19<sup>+</sup> KM PZ (Abb. 14A, C). Das MHC-II-Molekül HLADR wird generell auf reifen PZ nur schwach exprimiert, allerdings wies innerhalb der CD19<sup>+</sup> PZ-Fraktion ein geringer Prozentsatz der Zellen eine starke HLADR-Expression auf. In der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ -

Population konnten HLADR<sup>stark</sup> exprimierende Zellen hingegen nicht nachgewiesen werden (Abb. 14B, D).

Zusammengefasst bestätigte die durchflusszytometrische Messung von PZ-Markern die bereits in der Genexpressionsanalyse nachgewiesene ausgeprägte Expression von CD38, CD27 und CD138 auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> sowie die differenzielle Expression von HLADR und HLA-ABC.

#### 3.1.4.2 Untersuchung der Expression von Ki67 als Proliferationsmarker

Da Plasmablasten (PB) als Vorläufer reifer PZ noch CD19 exprimieren, stellte sich die Frage, ob die im KM nachweisbaren CD19<sup>+</sup> CD38<sup>++</sup> Zellen eventuell PB mit residualer Ki67 Expression sind, während nur die CD19<sup>(-)</sup> CD38<sup>++</sup> Zellen reife PZ ohne Nachweis von Ki67 darstellen. Im Gegensatz zu PZ können PB migrieren und sind teilungsfähig (Mei et al., 2009a; Odendahl et al., 2005). Die Fähigkeit zur Proliferation kann durchflusszytometrisch anhand der Expression von Ki67 ermittelt werden, einem Protein, das während der aktiven Zellzyklus-Phasen nachweisbar ist, in ruhenden Zellen jedoch fehlt (Scholzen und Gerdes, 2000).

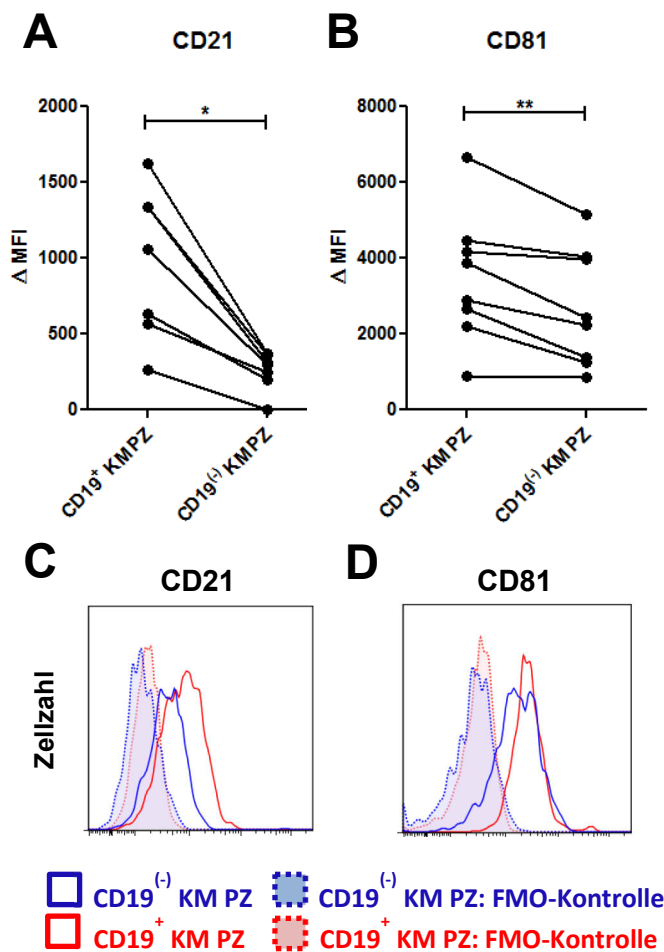


**Abb. 15: Durchflusszytometrische Analyse der Ki67-Expression auf PB und PZ.** Mononukleäre Zellen aus KM im Grundzustand (n=9) und Blut im Grundzustand (n=8) bzw. sieben Tage nach Vakzinierung mit Tetanus-Toxoid (TT, n=3) wurden isoliert, mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle markiert und intrazellulär mit einem Anti-Ki67-Antikörper gefärbt. Während CD27<sup>++</sup> CD38<sup>++</sup> Blut PB einen hohen Anteil an Ki67<sup>+</sup> Zellen aufweisen, zeigen nur wenige CD38<sup>++</sup> KM PZ eine Expression dieses Proliferationsmarkers. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Ki67<sup>+</sup> Zellen innerhalb der PZ- bzw. PB-Population in den untersuchten Proben, der jeweilige Mittelwert sowie die Signifikanzen aus dem Vergleich verschiedener Proben (Mann-Whitney-U-Test) oder gleicher KM-Proben (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001.

Um zu analysieren, ob es sich sowohl bei CD19<sup>(-)</sup> als auch bei CD19<sup>+</sup> KM PZ um reife, nicht proliferierende PZ handelt, wurden mononukleäre Zellen aus KM-Proben sowie aus peripherem Blut gesunder Probanden im Grundzustand oder sieben Tage nach einer Impfung gegen Tetanus gewonnen und mit Antikörpern gegen Ki67 intrazellulär gefärbt. Während im Blut eine Woche nach sekundärer Immunisierung ein Großteil der CD38<sup>++</sup> CD27<sup>++</sup> PB/PZ als Ki67<sup>+</sup> PB detektierbar waren (76,2% ± 5,5%), zeigte sich im Grundzustand ein variabler Anteil von durchschnittlich 50% (± 20%) als Ki67<sup>+</sup> PB. Im Gegensatz hierzu waren Ki67<sup>+</sup> Zellen sowohl innerhalb der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Population als auch der CD19<sup>+</sup> KM PZ Population kaum nachweisbar (0,9% ± 1,0% bzw. 1,9% ± 2,3%) (Abb. 15). Obwohl unter CD19<sup>+</sup> KM PZ ein signifikant höherer Anteil Ki67 exprimiert als in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, war die Anzahl detektierter Ki67<sup>+</sup> Zellen so gering, dass festgehalten werden kann, dass beide KM PZ Fraktionen folglich aus reifen, nicht proliferierenden PZ bestehen.

### 3.1.4.3 Expression von Ko-Rezeptoren des CD19-Komplexes

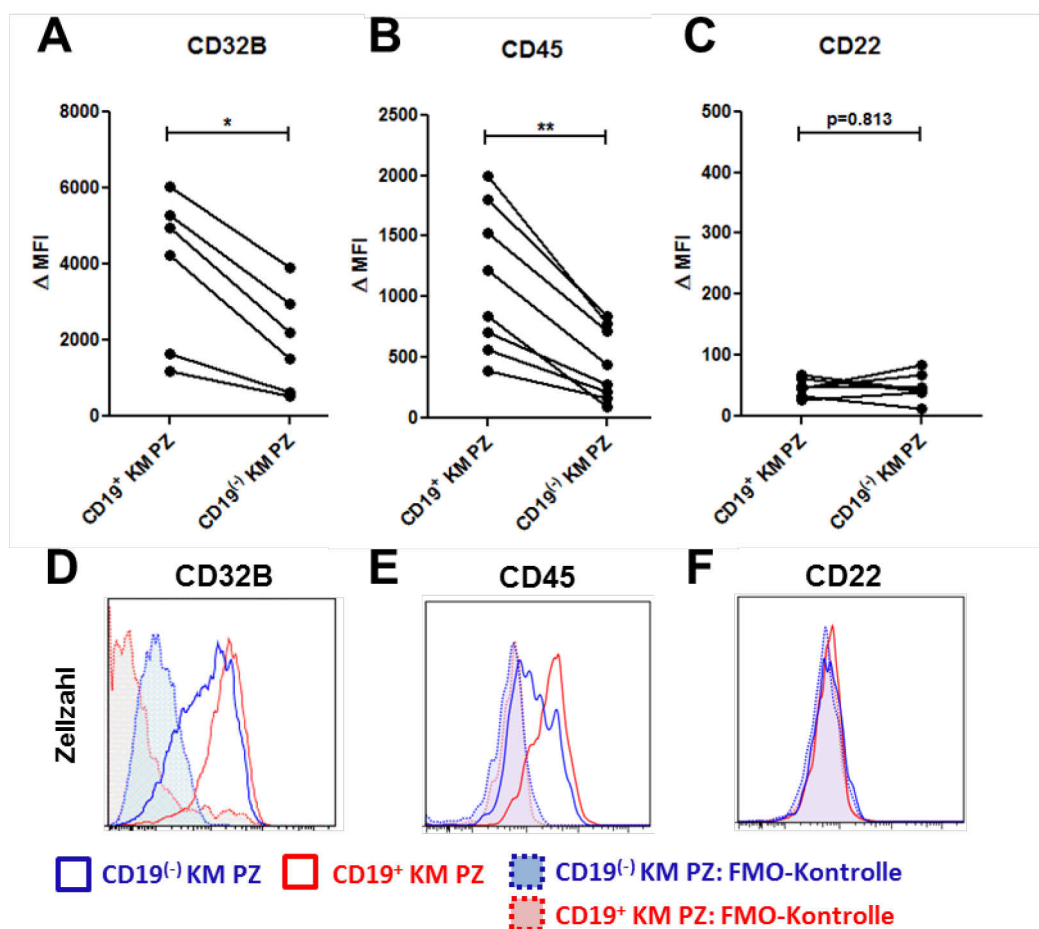
Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, ist CD19 Teil eines Ko-Rezeptoren-Komplexes auf B-Lymphozyten, bestehend aus CD19, CD21 und CD81. Um zu überprüfen, ob sich CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ auch anhand der Expression weiterer Ko-Rezeptoren unterscheiden lassen, sollte untersucht werden, ob neben CD19 auch CD21 und CD81 auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ herunterreguliert werden. Die durchflusszytometrische Analyse konnte bestätigen, dass sowohl CD21 als auch CD81 auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant weniger exprimiert werden als auf CD19<sup>+</sup> KM PZ. Dennoch waren beide Marker in beiden PZ-Populationen auf der Oberfläche grundsätzlich detektierbar (Abb. 16).



**Abb. 16: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Ko-Molekülen des CD19-Komplexes auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.** Mononukleäre Zellen aus KM wurden wie in Kapitel 2 beschrieben isoliert und mit Antikörpern gefärbt. KM PZ wurden als CD3<sup>(-)</sup> CD14<sup>(-)</sup> Dapi<sup>(-)</sup> CD38<sup>++</sup> Zellen eingegrenzt. Sowohl CD21 (A, C) als auch CD81 (B, D) werden auf CD19<sup>+</sup> KM PZ in signifikant höherem Maße exprimiert als auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. A-B) Dargestellt ist die Differenz aus MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) des Markers und MFI einer zugehörigen FMO-Kontrolle (ΔMFI) aus mindestens sieben KM-Proben. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01. C-D) Exemplarische Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse. CD19<sup>(-)</sup> KM PZ sind als blaue durchgezogene Linie abgebildet, CD19<sup>+</sup> KM PZ als rote durchgezogene Linie. FMO-Kontrollen sind als schattierte, gestrichelte Linien in der zugehörigen Farbe dargestellt.

### 3.1.4.4 Expression von Rezeptoren mit Einfluss auf B-Zell-Rezeptor-Signalwege

Neben der kostimulatorischen Funktion von CD19 auf B-Lymphozyten haben weitere Rezeptoren ebenfalls einen Einfluss auf den B-Zell-Rezeptor-(BZR-)Signalweg. FcγRIIb (CD32B) ist der am stärksten exprimierte Fc-Rezeptor auf B-Lymphozyten und PZ und besitzt eine niedrige Affinität für IgG. Die Ligation von CD32B hat eine inhibitorische Wirkung auf den BZR-Signalweg und bewirkt u. a. eine Reduktion der B-Zell-Expansion und PZ-Differenzierung (Coggeshall, 1998; Karnell et al., 2014; Ravetch und Bolland, 2001). Darüber hinaus wurde berichtet, dass Bindung an den Rezeptor in die Kompetition von KM PZ in der Maus involviert sein könnte und so das Überleben von PZ in diesem Kompartiment regulieren könnte (Xiang et al., 2007).



**Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Ko-Rezeptoren des B-Zell-Rezeptor-Signalwegs auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>-</sup> KM PZ.** Mononukleäre Zellen aus KM wurden wie in Kapitel 2 beschrieben isoliert und mit Antikörpern gefärbt. KM PZ wurden als CD3<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> Dapi<sup>-</sup> CD38<sup>++</sup> Zellen eingegrenzt. Während CD32B (A, D) und CD45 (B, E) auf beiden PZ-Populationen nachgewiesen werden können, wobei diese Ko-Rezeptoren von CD19<sup>+</sup> KM PZ in signifikant höherem Maße exprimiert werden als von CD19<sup>-</sup> KM PZ, wird CD22 auf beiden PZ-Populationen nicht exprimiert (C, F). A-C) Dargestellt ist die Differenz aus MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) des Markers und MFI einer zugehörigen FMO-Kontrolle (ΔMFI) aus mindestens sechs KM-Proben. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01. D-F) Exemplarische Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse der Expression von CD32B (D), CD45 (E) und CD22 (F). CD19<sup>-</sup> KM PZ sind als blaue durchgezogene Linie abgebildet, CD19<sup>+</sup> KM PZ als rote durchgezogene Linie. FMO-Kontrollen sind als schattierte, gestrichelte Linien in der zugehörigen Farbe dargestellt.

Eine durchflusszytometrische Untersuchung der CD32B-Expression auf CD19<sup>(-)</sup> und CD19<sup>+</sup> KM PZ mit dem CD32B-spezifischen Antikörper 2B6 (Veri et al., 2007) ergab eine signifikante Reduktion der Expression von FcγRIIb auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ (Abb. 17A, D). Auch der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor Typ C, CD45, wird auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant schwächer exprimiert als auf CD19<sup>+</sup> KM PZ (Abb. 17B, E). CD45 wird auf verschiedenen Leukozyten, u. a. auf B- und T-Zellen exprimiert und reguliert die Signaltransduktion durch Modulation des Phosphorylierungsstatus der Antigen-Rezeptor-Untereinheiten (Brown et al., 1994; Justement et al., 1991). Ein weiteres Molekül mit Einfluss auf den BZR-Signalweg ist CD22, ein Mitglied der Ig-Superfamilie und Rezeptor für N-Acetylneuraminsäure. Die Bindung an CD22 hat eine inhibitorische Wirkung auf die BZR-Signaltransduktion und ist somit ein weiterer Faktor, der die Immunantwort von B-Zellen reguliert (1.4.3). In Übereinstimmung mit dem aktuellen Stand der Literatur kann CD22 jedoch weder auf CD19<sup>+</sup> KM PZ noch auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nachgewiesen werden (Abb. 17 C, F) (Medina et al., 2002).

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass sich die beiden untersuchten KM PZ Populationen nicht nur in der Expression von CD19, sondern auch in der Expression weiterer Ko-Rezeptoren wie CD21, CD81, CD32B und CD45 unterscheiden. Jedoch ist CD19 das einzige dieser Ko-Rezeptor-Moleküle, anhand dessen die beiden KM PZ Populationen eindeutig voneinander abgrenzbar sind, da sie von oben genannten Proteinen nur CD19 entweder „exprimieren“ oder „nicht exprimieren“.

#### 3.1.4.5 Expression von Adhäsionsmolekülen und Molekülen mit Einfluss auf das Migrationsverhalten von Zellen

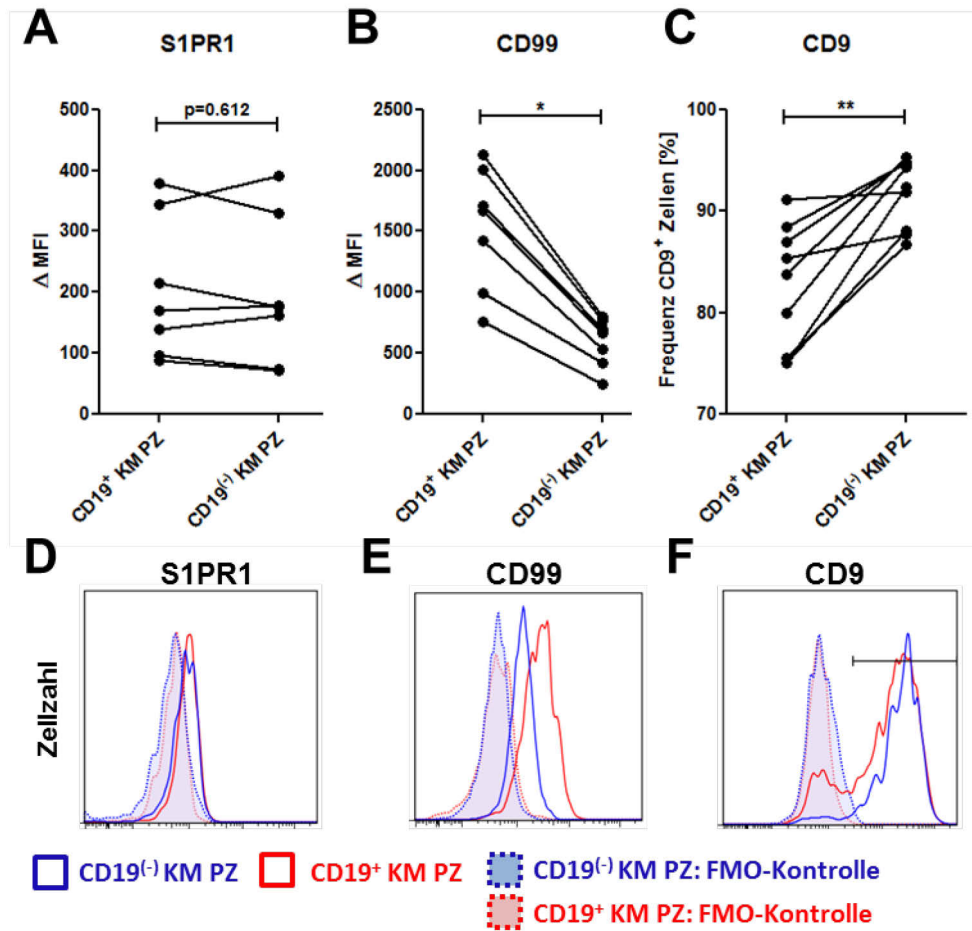
Zur Überprüfung der Genexpressionsdaten, die eine unterschiedliche Expression von Migrations- und Adhäsionsmolekülen in CD19<sup>+</sup> versus CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nahe legen, wurden die Signalstärken einiger Oberflächenmoleküle, die eine besondere Rolle in der Migration von B-Zellen und PB spielen, durchflusszytometrisch analysiert.

Die Expression von Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor 1 (S1PR1) auf Lymphozyten ist ein wichtiger Faktor für den erfolgreichen Austritt dieser Zellen aus lymphatischen Organen ins Blut (Matloubian et al., 2004). CD62L (L-Selektin, SELP) hingegen vermittelt die Immigration von Zellen aus dem Blut in sekundäre lymphatische Organe durch Bindung von Liganden auf Endothelzellen, wodurch eine Verlangsamung der Zellen im Blutfluss und das Rollen entlang der Gefäßwand bewirkt wird (Berg et al., 1993; Butcher und Picker, 1996; Gallatin et al., 1983; Hamann et al., 1991). Dies ist die erste Stufe eines Prozesses, an dessen Ende der erfolgreiche Eintritt der Lymphozyten in lymphatische Organe, die sogenannte Extravasation, steht. Eine Untersuchung der Expression von S1PR1 und CD62L auf KM PZ zeigte, dass beide Oberflächenmoleküle sowohl auf CD19<sup>+</sup> als auch auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nur sehr schwach oder gar nicht nachweisbar sind. Ein Unterschied in der Expressionsstärke war zwischen den beiden PZ-Populationen nicht nachweisbar (Abb. 18A, D und Abb. 19D, H).

Ein weiterer Faktor für die Migration von Lymphozyten und deren *homing* ist CCR10, dessen Ligand CCL28 von einer Vielzahl an mukosalen Geweben, aber auch im KM produziert wird (zusammengefasst in Kunkel und Butcher, 2003). CCR10 ist auf der Oberfläche von IgA<sup>+</sup> PZ nachweisbar und dient deren Migration in mukosale Gewebe (zusammengefasst in Kunkel und Butcher, 2003). Die durchflusszytometrische Analyse von CCR10 ergab eine erhöhte Expression dieses Rezeptors auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ verglichen mit CD19<sup>+</sup> KM PZ (Abb. 19A, E).

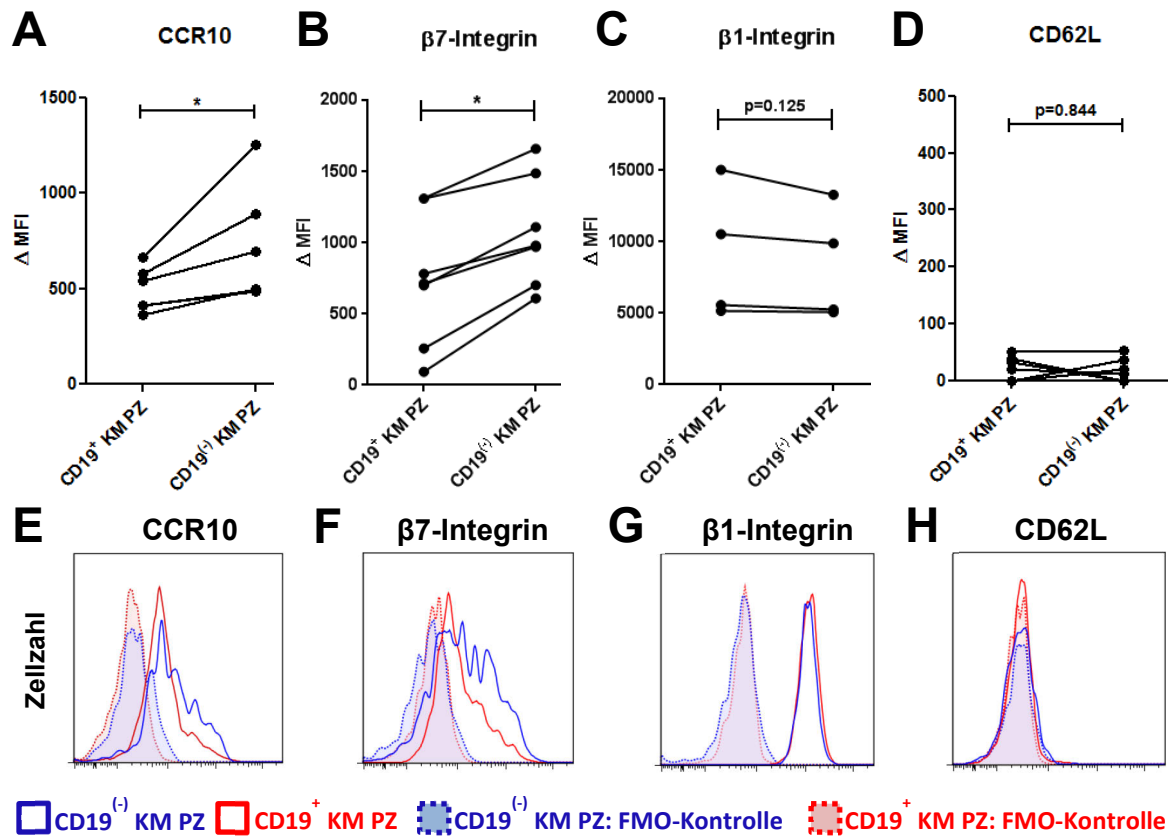
Ebenso wie CD62L spielen auch Integrine bei der Migration und Adhäsion von Zellen eine große Rolle. Auf PB und PZ werden hauptsächlich die Adhäsionsmoleküle  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin und  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin gebildet (Kantele et al., 1998; Van Riet et al., 1991). Dabei wird  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin wie CCR10 zu den mukosalen *homing*-Molekülen gezählt, da MadCAM-1, ein Ligand von  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, vorwiegend in Geweben des Magen-Darm-Traktes und in Milchdrüsen zu finden ist. VCAM-1, ein Ligand für  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, wird hingegen in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, u. a. auch im KM (zusammengefasst in Kunkel und Butcher, 2003). Sowohl auf CD19<sup>+</sup> als auch auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ konnte eine hohe Expression von  $\beta 1$ -Integrin nachgewiesen werden (Abb. 19C, G), während  $\beta 7$ -Integrin in stärkerem Maße auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ detektiert wurde als auf CD19<sup>+</sup> KM PZ (Abb. 19B, F).

Tetraspanine können auf die Funktion von Integrinen einwirken, indem sie u. a. die Aktivierung und Ligandenbindung der Integrine (Yanez-Mo et al., 2009) sowie die Signalweiterleitung und Endozytose dieser Adhäsionsmoleküle beeinflussen (zusammengefasst in Berditshevski, 2001). Somit spielt auch das Tetraspanin CD9 eine wichtige Rolle in der Zellmigration, insbesondere bei der Einwanderung von Zellen entlang der CXCL12/CXCR4-Achse ins KM (Leung et al., 2011). CD9 wird während der PZ-Differenzierung auf Keimzentrums-B-Zellen hochreguliert und wurde als Diskriminierungsmarker zwischen jenen Zellen, die sich zu PB weiter entwickeln und jenen, die zu Gedächtnis-B-Zellen differenzieren, vorgeschlagen (Yoon et al., 2013). Die durchflusszytometrische Untersuchung der CD9-Expression auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zeigte, dass dieses Tetraspanin auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ in höherem Maße nachweisbar ist als auf CD19<sup>+</sup> KM PZ (Abb. 18C, F). Umgekehrt wird CD99, ein Glykoprotein, welches ebenfalls an der Extravasation und Diapedese von Leukozyten beteiligt ist (Bixel et al., 2004; Schenkel et al., 2002), auf CD19<sup>+</sup> KM PZ stärker exprimiert als auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ (Abb. 18B, E).



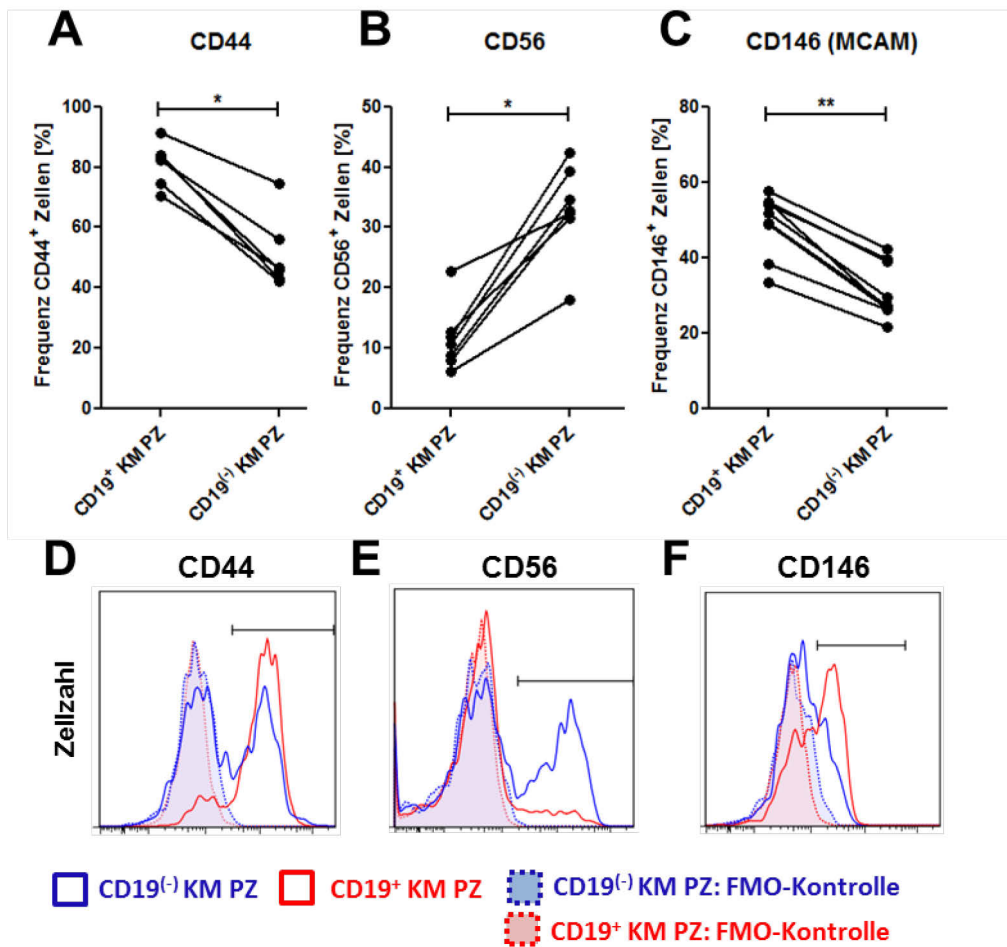
**Abb. 18: Durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von Migrationsmolekülen auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>-</sup> KM PZ.** Mononukleäre Zellen aus KM wurden wie in Kapitel 2 beschrieben isoliert und mit Antikörpern gefärbt. KM PZ wurden als CD3<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> Dapi<sup>-</sup> CD38<sup>++</sup> Zellen eingegrenzt. Während S1PR1 von beiden Zell-Populationen nur in geringem Maße exprimiert wird (A, D), ist CD99 auf CD19<sup>+</sup> KM PZ signifikant stärker nachweisbar als auf CD19<sup>-</sup> KM PZ (B, F). CD9 hingegen ist auf fast allen CD19<sup>-</sup> KM PZ exprimiert, während eine kleine Population an CD19<sup>+</sup> KM PZ CD9 nicht exprimiert (C, F). A-C) Dargestellt ist die Differenz aus MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) des Markers und MFI einer zugehörigen FMO-Kontrolle ( $\Delta$ MFI) bzw. der prozentuale Anteil an CD9<sup>+</sup> Zellen aus mindestens sieben KM-Proben. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ . D-F) Exemplarische Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse. CD19<sup>-</sup> KM PZ sind als blaue durchgezogene Linie abgebildet, CD19<sup>+</sup> KM PZ als rote durchgezogene Linie. FMO-Kontrollen sind als schattierte, gestrichelte Linien in der zugehörigen Farbe dargestellt. Die Eingrenzung von CD9 exprimierenden Zellen ist als schwarzer horizontaler Balken eingefügt.





**Abb. 19: Durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von Adhäsions- und Migrationsmolekülen auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.** Mononukleäre Zellen aus KM wurden wie in Kapitel 2 beschrieben isoliert und mit Antikörpern gefärbt. KM PZ wurden als CD3<sup>(-)</sup> CD14<sup>(-)</sup> Dapi<sup>(-)</sup> CD38<sup>++</sup> Zellen eingegrenzt. Sowohl CCR10 (A, E) als auch β7-Integrin (B, F) werden von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant stärker exprimiert als von CD19<sup>+</sup> KM PZ. β1-Integrin wird von beiden Zell-Populationen in gleich hohem Maße exprimiert (C, G), während CD62L nicht auf der Zelloberfläche angefärbt werden konnte (D, H). A-D) Dargestellt ist die Differenz aus MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) des Markers und MFI einer zugehörigen FMO-Kontrolle (ΔMFI) aus mindestens vier KM-Proben. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; \*, p<0,05. E-H) Exemplarische Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse. CD19<sup>(-)</sup> KM PZ sind als blaue durchgezogene Linie abgebildet, CD19<sup>+</sup> KM PZ als rote durchgezogene Linie. FMO-Kontrollen sind als schattierte, gestrichelte Linien in der zugehörigen Farbe dargestellt.

Die Extravasation und Migration von Lymphozyten kann auch durch Expression von CD146 (MCAM), einem weiteren Rezeptor für VCAM-1, gefördert werden (Guezguez et al., 2007). Zudem kann CD146 eine Rolle in der *in situ* Lokalisation von KM-Zellen spielen (Tormin et al., 2011). Beim durchflusszytometrischen Vergleich der CD146-Expression auf KM PZ zeigte sich, dass eine signifikant höhere Zellzahl in der CD19<sup>+</sup> KM PZ Fraktion dieses Adhäsionsmolekül exprimiert als in der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Population (Abb. 20C, F). Ein vergleichbares Ergebnis brachte die Analyse von CD44, dem *lymphocyte homing receptor* bzw. Rezeptor für Hyaluronsäure. Neben seiner Funktion als Mediator von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten (Goodison et al., 1999) gibt es Hinweise darauf, dass CD44 auch das Überleben von KM PZ fördern kann (Cassese et al., 2003). Die durchflusszytometrische Untersuchung der CD44-Expression zeigte bei CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine bimodale Verteilung, während bei einem Großteil der CD19<sup>+</sup> KM PZ CD44 auf der Oberfläche nachweisbar war (Abb. 20A, D).



**Abb. 20: Durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von Adhäsionsmolekülen auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>-</sup> KM PZ.** Mononukleäre Zellen aus KM wurden wie in Kapitel 2 beschrieben isoliert und mit Antikörpern gefärbt. KM PZ wurden als CD3<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> Dapi<sup>-</sup> CD38<sup>+</sup> Zellen eingegrenzt. Sowohl CD44 (A, D) als auch CD146 (C, F) werden vermehrt auf CD19<sup>+</sup> KM PZ exprimiert, während CD56 (B, E) hauptsächlich auf einem Teil der CD19<sup>-</sup> KM PZ Population nachgewiesen werden kann. A-C) Dargestellt ist der prozentuale Anteil an CD19<sup>+</sup> bzw. CD19<sup>-</sup> KM PZ, die den jeweiligen Marker exprimieren.  $n \geq 6$ , Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ . D-F) Exemplarische Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse. CD19<sup>-</sup> KM PZ sind als blaue durchgezogene Linie abgebildet, CD19<sup>+</sup> KM PZ als rote durchgezogene Linie. FMO-Kontrollen sind als schattierte, gestrichelte Linien in der zugehörigen Farbe dargestellt. Die Eingrenzung der positiven Zellen ist jeweils als schwarzer horizontaler Balken eingefügt.

Ein weiteres Adhäsionsmolekül mit Relevanz in der PZ-Biologie ist CD56 (NCAM), welches ursprünglich als Marker von NK-Zellen bezeichnet wurde (zusammengefasst in Cooper et al., 2001). Da Untersuchungen ergeben haben, dass CD56 auf PZ von Patienten mit multiplem Myelom (MM) exprimiert wird (Van Camp et al., 1990) und diese MM PZ kein CD19 auf ihrer Oberfläche haben (Jackson et al., 1988), wurde die CD56-Expression in der vorliegenden Arbeit auch auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>-</sup> KM PZ gesunder Probanden untersucht. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass bei Gesunden ein Teil der CD19<sup>-</sup> KM PZ CD56 exprimiert, während CD19<sup>+</sup> KM PZ hauptsächlich negativ für CD56 sind (Abb. 20B, F). Da allerdings auch bei >50% der CD19<sup>-</sup> KM PZ kein CD56 auf der Oberfläche nachweisbar ist, konnte CD56 als Marker für alle CD19<sup>-</sup> KM PZ in gesunden Donoren nicht bestätigt werden.

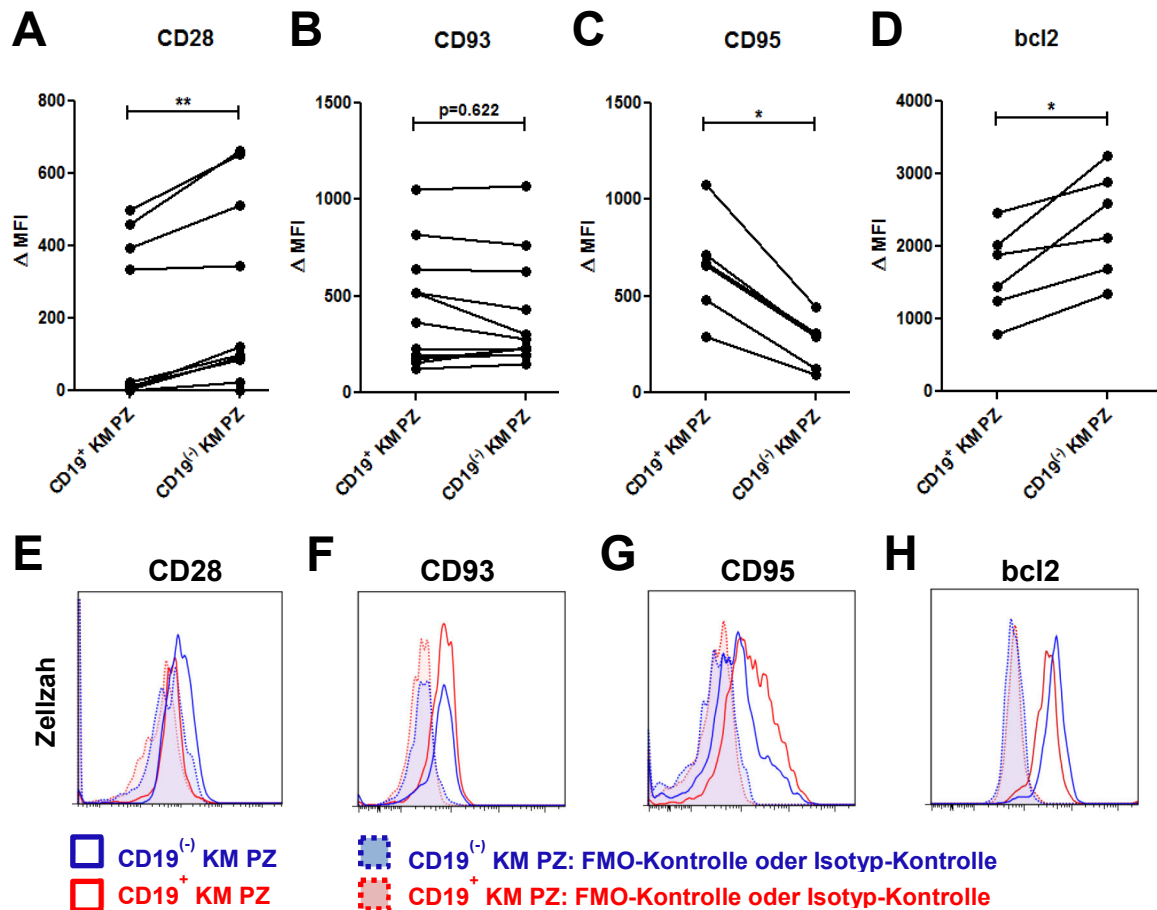
Insgesamt konnte die durchflusszytometrische Untersuchung von Migrations- und Adhäsionsmolekülen die in der Genexpressionsanalyse festgestellte unterschiedliche Ausprägung in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ bestätigen und weitere Faktoren identifizieren, die in den beiden untersuchten Populationen unterschiedlich stark exprimiert sind.

#### 3.1.4.6 Expression von Molekülen mit Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von Plasmazellen

Im Hinblick auf ein möglicherweise unterschiedliches Potential für Langlebigkeit bei CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ sollte auch die Expression von Proteinen untersucht werden, die das Überleben von Plasmazellen *in situ* fördern oder behindern können.

Ein bekanntes pro-apoptotisches Molekül ist CD95 (Fas/Apo-1), ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, das nach Ligandenbindung die Bildung von DISC (*death-inducing signaling complex*) und eine Aktivierung von Caspasen bewirkt, welche in den programmierten Zelltod mündet (Trauth et al., 1989; Yonehara, 1999). Dieser extrinsische Apoptoseweg ist ein Mechanismus, mit dessen Hilfe z. B. autoreaktive Lymphozyten eliminiert werden können (zusammengefasst in Sharma et al., 2000). Die durchflusszytometrische Analyse der CD95-Expression auf KM PZ zeigte eine signifikant höhere Signalstärke dieses Moleküls auf CD19<sup>+</sup> KM PZ (Abb. 21C, G). Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass auch CD28 einen Einfluss auf das Überleben und die Funktionalität von KM PZ haben kann. Dies wurde zunächst bei malignen PZ festgestellt (Bahlis et al., 2007) und später auch für langlebige gesunde KM PZ in Mausexperimenten gezeigt (Rozanski et al., 2011). In humanen KM-Proben konnte eine erhöhte CD28-Expression auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ detektiert werden, während CD28 auf CD19<sup>+</sup> KM PZ kaum nachweisbar war (Abb. 21A, E). Im Gegensatz hierzu konnte CD93, ein Transmembranrezeptor, welcher ebenfalls das Überleben von PZ im KM fördert (Chevrier et al., 2009) auf beiden KM PZ Populationen in vergleichbarem Maß detektiert werden (Abb. 21B, F). Schließlich wurde auch die Expression des antiapoptotischen Faktors Bcl2 in KM PZ überprüft. Hierbei konnte eine signifikant stärkere Expression von Bcl2 in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ verglichen mit CD19<sup>+</sup> KM PZ festgestellt werden (Abb. 21D, H).

Folglich zeigen die durchflusszytometrischen Daten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse, dass einige wichtige antiapoptotische Moleküle in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ stärker exprimiert werden als in CD19<sup>+</sup> KM PZ, und geben Hinweise auf eine möglicherweise bessere Überlebensfähigkeit der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Population.



**Abb. 21: Durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von Molekülen mit Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.** Mononukleäre Zellen aus KM wurden wie in Kapitel 2 beschrieben isoliert und mit Antikörpern gefärbt. KM PZ wurden als CD3<sup>(-)</sup> CD14<sup>(-)</sup> (Dapi<sup>(-)</sup>) CD38<sup>++</sup> Zellen eingegrenzt. Der pro-apoptotische Faktor CD95 (C, G) zeigt auf CD19<sup>+</sup> KM PZ eine höhere Fluoreszenzintensität als auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. Die überlebensfördernden Faktoren CD28 (A, E) und bcl2 (D, H) werden hingegen von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ stärker exprimiert als von CD19<sup>+</sup> KM PZ. Der antiapoptotische Rezeptor CD93 (C, G) ist auf beiden PZ-Populationen in ähnlichem Maß nachweisbar. A-D) Dargestellt ist die Differenz aus MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) des untersuchten Markers und MFI einer zugehörigen Negativkontrolle (ΔMFI) aus mindestens sechs KM-Proben. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; \*, p<0,05; \*\*, p<0,01. E-H) Exemplarische Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse. CD19<sup>(-)</sup> KM PZ sind als blaue durchgezogene Linie abgebildet, CD19<sup>+</sup> KM PZ als rote durchgezogene Linie. Als Negativkontrollen dienten FMO-Kontrollen (E-G) oder Isotyp-Kontrollen (H). Diese sind als schattierte, gestrichelte Linien in der zugehörigen Farbe dargestellt.

### 3.1.4.7 Vergleich der Affymetrix-Daten mit den Ergebnissen aus der Durchflusszytometrie

Tabelle 12 fasst die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von CD19<sup>+</sup> versus CD19<sup>(-)</sup> KM PZ vergleichend mit den Daten aus der Genexpressionsanalyse zusammen. Hier kann festgestellt werden, dass ein Großteil der untersuchten Moleküle bei Betrachtung der Proteinmenge in den KM PZ Populationen signifikant differenziell exprimiert wird, auch wenn der Datensatz des Affymetrix-Microarrays keine Signifikanz in der Menge der entsprechenden mRNA-Transkripte aufwies. Insgesamt lassen die Ergebnisse aus Genexpressionsanalyse und Durchflusszytometrie vermuten, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ einen höheren Reifegrad

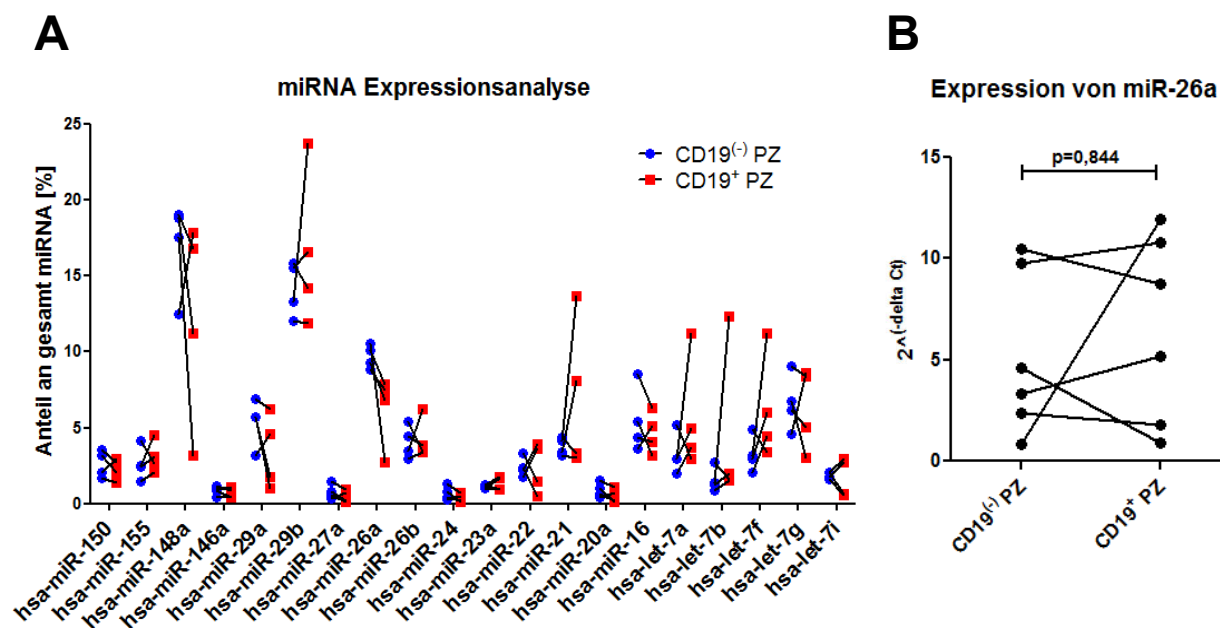
besitzen als CD19<sup>+</sup> KM PZ, da Aktivierungsmarker und einige typische B-Zell-Moleküle auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ weniger stark exprimiert werden. Des Weiteren könnte die differenzielle Ausprägung von Adhäsions- und Migrationsproteinen auf eine unterschiedliche Lokalisation der KM PZ Populationen in der KM-Nische hindeuten. Eine histologische Darstellung der Lokalisation von PZ im humanen KM sowie die Ausprägung möglicher Kontakte zu anderen Zelltypen war jedoch aufgrund technischer Limitierungen nicht möglich (siehe 4.3.2.3). Zudem weisen CD19<sup>(-)</sup> KM PZ ein verstärkt antiapoptotisches Profil auf und könnten somit als langlebige PZ einen wichtigen Beitrag zum Erhalt des humoralen Gedächtnisses leisten.

**Tabelle 12: Vergleich der Ergebnisse aus Durchflusszytometrie und Affymetrix-Genexpressionsanalyse für CD19<sup>+</sup> KM PZ und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.** n.s., nicht signifikant.

Molekül	Genexpressionsanalyse: verstärkt exprimiert in	Durchflusszytometrie: verstärkt exprimiert in/auf	Funktion
CD138	n.s.	n.s.	Adhäsion
CD38	n.s.	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	Aktivierung
CD27	n.s.	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	Aktivierung, Differenzierung
PTPRC (CD45)	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	Lymphozytenmarker
CD81	n.s.	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	Ko-Rezeptor
CD21	n.s.	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	Ko-Rezeptor
CD22	n.s.	n.s.	neg. regulierender Ko- Rezeptor des B-Zell- Signalweg
Syk	n.s.	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	B-Zell-Signalweg
HLADR	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	Antigenpräsentation
HLA-ABC	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	Apoptoseschutz
CD44	n.s.	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	Adhäsion, Migration
NCAM (CD56)	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	Adhäsion
MCAM (CD146)	n.s.	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	Adhäsion, Migration
SELL (CD62L)	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	n.s.	Adhäsion, Migration
β1-Integrin	n.s.	n.s.	Adhäsion, Migration
β7-Integrin	n.s.	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	Adhäsion, Migration
CCR10	n.s.	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	Migration
CD9	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	Adhäsion, Migration
CD99	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	Adhäsion, Migration, Aktivierung, Apoptose
S1PR1	n.s.	n.s.	Migration
CD28	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	Überleben von PZ
CD93	n.s.	n.s.	Reifungsmarker, Überleben von PZ
CD32B	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	Apoptose
CD95	n.s.	CD19 <sup>+</sup> KM PZ	Apoptose
Bcl2	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ	Anti-Apoptose

### 3.1.5 Expressionsanalyse von microRNAs bei CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ

Bei der Frage nach Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ müssen auch Mechanismen der Genregulation in Betracht gezogen werden. Wichtige Faktoren in diesem komplexen Netzwerk sind microRNAs (miRNA oder miR), kleine RNAs mit einer Größe von 21-23 Nukleotiden, die auf posttranskriptioneller Ebene in die Genexpression eingreifen können. Dies geschieht je nach Komplementarität der miRNA entweder durch Hemmung der Translation oder durch Degradation der Ziel-mRNA (Banerjee und Slack, 2002; Bartel, 2009). Da in vorangegangenen Experimenten bereits nachgewiesen werden konnte, dass einige Proteine in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ unterschiedlich stark exprimiert werden, stellte sich die Frage, ob miRNAs eine Rolle bei dieser unterschiedlichen Expression spielen könnten. Hierzu wurden CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren isoliert und einer miRNA-Expressionsanalyse mittels *deep sequencing* unterzogen (2.12). Das dabei erstellte Expressionsprofil der miRNAs zeigte ähnliche Ergebnisse für beide KM PZ Populationen, nur miR-26a wies in allen vier Donoren eine stärkere Expression in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ auf (Abb. 22A). Eine anschließende Überprüfung der miR-26a-Expression in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ mittels quantitativer *realtime* PCR konnte diesen Befund jedoch nicht eindeutig sichern (Abb. 22B).



**Abb. 22: CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ weisen ein ähnliches miRNA Expressionsprofil auf.** A) CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden mittels kombiniertem MACS/FACS-Verfahren isoliert und einer *deep sequencing* miRNA Expressionsanalyse unterzogen (2.12). Angegeben sind alle exprimierten miRNAs, deren Anteil an Gesamt-miRNA mindestens 1% beträgt. B) Die Expression von hsa-miR-26a in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von sechs zusätzlichen Donoren wurde mit quantitativer *realtime* PCR analysiert, mit RNU6B normalisiert und mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verglichen (2.10).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ die untersuchten miRNAs wahrscheinlich keine Rolle in der posttranskriptionellen Regulation von mRNAs spielen, da hierfür eine stärkere oder schwächere

Ausprägung von miRNAs in einer der beiden PZ-Populationen zu erwarten wäre. Dies konnte in der vorliegenden Analyse jedoch nicht nachgewiesen werden.

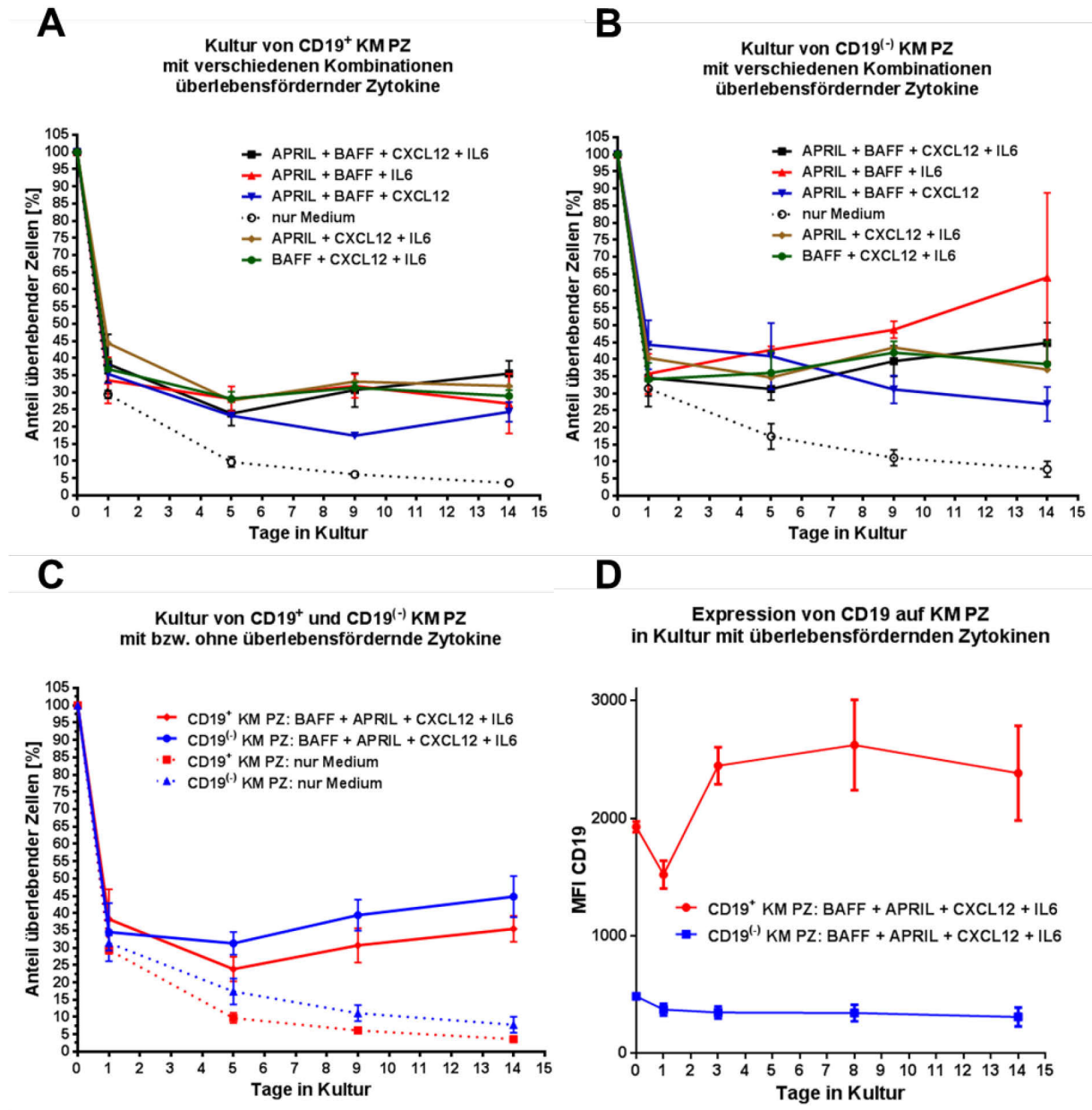
## **3.2 Funktionelle Analysen von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ**

### **3.2.1 Kultur von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ mit überlebensfördernden Faktoren**

Um zu testen, ob die in Kapitel 3.1 beschriebenen Unterschiede in der Expression von pro- und antiapoptotischen Faktoren einen Einfluss auf das Überleben von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ *in vitro* haben, wurden beide PZ-Fraktionen aus KM-Proben isoliert und mit verschiedenen Kombinationen aus Zytokinen, welche das Überleben von PZ in der KM-Nische fördern, kultiviert (Cassese et al., 2003; Chu et al., 2011).

Hierbei zeigte sich, dass unabhängig von der Kulturbedingung mehr als 50% der CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zwischen Tag 0 und Tag 1 der Zellkultur starben. Danach konnte jedoch ein positiver Effekt der Zytokine APRIL, BAFF, CXCL12 und IL6 auf das Überleben der Zellen verzeichnet werden, während die Zahl vitaler PZ, die ohne Beigabe von Zytokinen kultiviert wurden, über den beobachteten Zeitraum von zwei Wochen kontinuierlich abnahm (Abb. 23A, B). Welche Kombination der o.g. Zytokine gewählt wurde, schien keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der KM PZ zu haben. Zudem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ festgestellt werden (Abb. 23C), wobei im Kulturverlauf zumindest tendenziell ein höherer Prozentsatz an überlebenden Zellen in der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Population beobachtet wurde. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass während der Zellkultur keine Differenzierung von CD19<sup>+</sup> in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und umgekehrt stattfand, da die Expression von CD19 auf den isolierten Zellfraktionen im Verlauf der Kultur konstant blieb (Abb. 23D).





**Abb. 23: CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>-</sup> KMPZ weisen in Zellkultur ähnliche Überlebenskapazitäten auf.** CD19<sup>+</sup> bzw. CD19<sup>-</sup> KMPZ wurden mittels kombiniertem MACS/FACS-Verfahren isoliert und in RPMI-Medium mit verschiedenen Kombinationen der Zytokine BAFF, APRIL, CXCL12 und IL6 (durchgezogenen Linien) oder ohne Zugabe von Zytokinen (gestrichelte Linien) kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen aus der Kultur entnommen, mit Antikörpern gegen CD19, CD38 und CD138 sowie mit Dapi gefärbt und der Anteil überlebender Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (2.6). Dargestellt ist der exemplarische Kulturverlauf aus einem von drei unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus Triplikaten. A) Verlauf der Überlebensrate sortierter CD19<sup>+</sup> KMPZ unter verschiedenen Kulturbedingungen. B) Verlauf der Überlebensrate sortierter CD19<sup>-</sup> KMPZ unter verschiedenen Kulturbedingungen. C) Vergleich der Kulturverläufe von CD19<sup>+</sup> (rot) und CD19<sup>-</sup> (blau) KMPZ ohne Zugabe von Zytokinen (gestrichelte Linien) bzw. bei Kultivierung mit BAFF, APRIL, CXCL12 und IL6 (durchgezogene Linien). D) Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der CD19-Expression auf sortierten CD19<sup>+</sup> KMPZ (rot) und CD19<sup>-</sup> KMPZ (blau) bei Kultivierung mit BAFF, APRIL, CXCL12 und IL6.



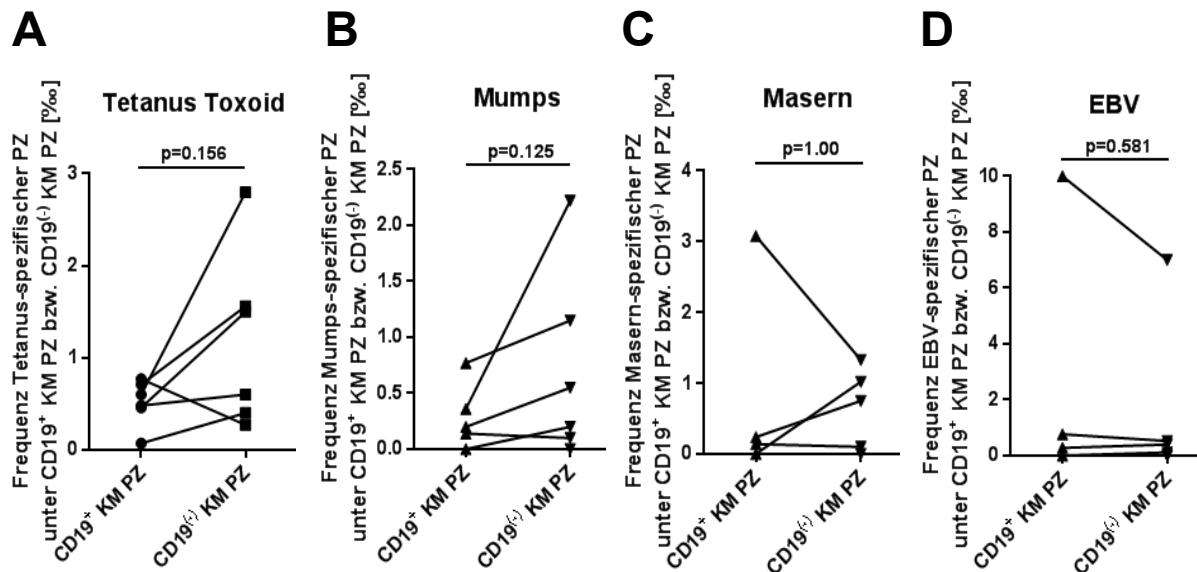
### 3.2.2 Untersuchungen zur Antigen-Spezifität von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ

Bei der Charakterisierung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ stellt sich u. a. die grundsätzliche Frage, aus welchen Vorläuferzellen sich diese beiden PZ-Populationen entwickeln und ob sie unterschiedliche Rollen in der Immunabwehr und Aufrechterhaltung des humoralen Gedächtnisses einnehmen. Angelehnt an die unterschiedlichen Halbwertszeiten von Antikörper-Titern (Amanna et al., 2007) wäre es denkbar, dass eine PZ-Population sich auf die Abwehr viraler Antigene spezialisiert, während die andere PZ-Population hauptsächlich Antikörper gegen bakterielle Proteine produziert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Antigen-Spezifitäten von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ mittels ELISpot und ELISA bestimmt.

#### 3.2.2.1 ELISpot

Basierend auf den Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert-Koch-Institut zu regelmäßigen Impfungen gegen Tetanus im Kindes- und Erwachsenenalter wurden CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von sechs Donoren isoliert und der Anteil der Tetanus-spezifischen PZ in jeder Population als Beispiel antibakterieller Immunabwehr mittels ELISpot bestimmt. Zum Nachweis antiviraler Antikörper-produzierender Zellen wurden CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ auf die Anwesenheit Mumps- oder Masern-spezifischer PZ hin getestet, da davon ausgegangen werden kann, dass die Mehrheit aller Erwachsenen in Europa entweder gegen Masern und Mumps geimpft wurde oder die Erkrankung bereits durchlitten hat. Da >90% aller Erwachsenen ab dem 40. Lebensjahr auch mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert sind, wobei die Ersterkrankung i.d.R. symptomlos verläuft, sollten beide KM PZ Populationen zusätzlich auch auf EBV-spezifische PZ hin untersucht werden.

Interessanterweise fanden sich für alle vier getesteten Antigene spezifische ASZ sowohl in der CD19<sup>+</sup> als auch in der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Fraktion, ein signifikanter Unterschied in der Frequenz dieser spezifischen Zellen konnte nicht festgestellt werden (Abb. 24). Diese Ergebnisse sprechen folglich gegen eine Spezialisierung der CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Population auf die Abwehr entweder viraler oder bakterieller Antigene.

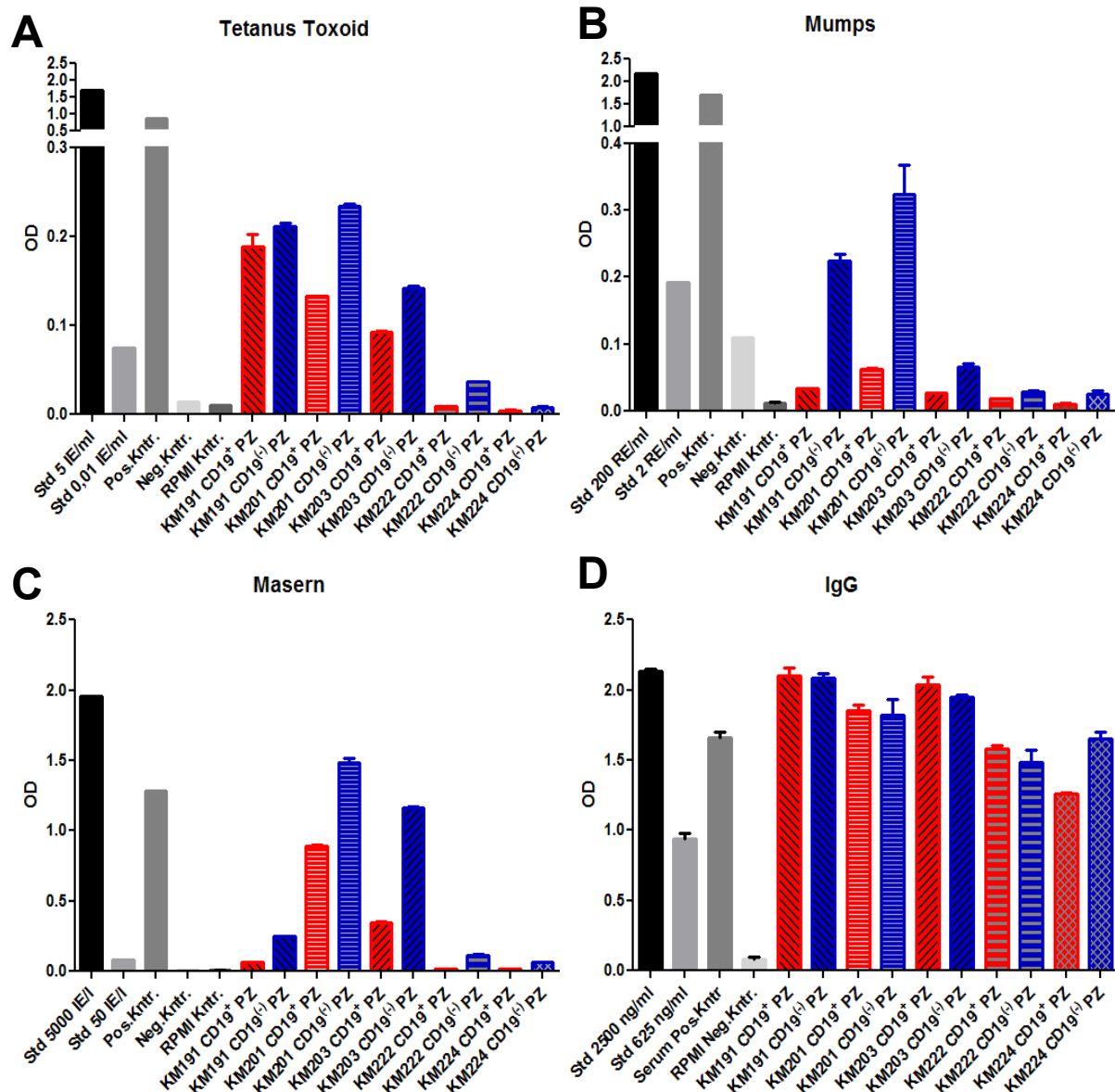


**Abb. 24:** Sowohl  $CD19^+$  als auch  $CD19^{(-)}$  KM PZ Populationen enthalten Antikörper-sezernierende Zellen, die spezifisch gegen Tetanus Toxoid, Mumps, Masern oder EBV sind.  $CD19^+$  und  $CD19^{(-)}$  KM PZ von sechs Donoren wurden isoliert und der Anteil spezifischer Zellen gegen Tetanus Toxoid (A), Mumps (B), Masern (C) und Epstein-Barr-Virus (EBV, D) in beiden Populationen mittels ELISpot bestimmt (2.8). Angegeben sind die Mediane der Einzelwerte aus jedem der sechs unabhängigen Experimente sowie die mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ermittelten p-Werte.

### 3.2.2.2 ELISA

Eine weitere Methode, antigenspezifische ASZ in einer Population nachzuweisen, bietet das ELISA-Verfahren (2.7). Hierfür wurde die jeweils gleiche Anzahl an  $CD19^+$  und  $CD19^{(-)}$  KM PZ isoliert und in Kultur genommen. Die dabei sezernierten Antikörper können anschließend in den Kulturüberständen detektiert werden. Analog zu den ELISpot-Ergebnissen konnten Tetanus-, Mumps- und Masern-spezifische Antikörper des IgG-Isotyps sowohl in der  $CD19^+$  als auch in der  $CD19^{(-)}$  KM PZ Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 25A-C). Dabei zeigte sich für alle drei Antigene eine tendenziell höhere Konzentration spezifischer Antikörper in der  $CD19^{(-)}$  KM PZ Population. Diese Beobachtung ist jedoch nicht auf eine möglicherweise insgesamt stärkere IgG-Produktion bei  $CD19^{(-)}$  KM PZ zurück zu führen, da eine Messung des Gesamt-IgG-Spiegels in den Kulturüberständen vergleichbare Ergebnisse für  $CD19^+$  und  $CD19^{(-)}$  KM PZ lieferte (Abb. 25D).

Insgesamt zeigen die erhobenen Daten aus ELISpot und ELISA, dass beide untersuchten KM PZ Populationen zur humoralen Immunität beitragen. Die gemeinsamen Antigen-Spezifitäten von  $CD19^+$  und  $CD19^{(-)}$  KM PZ sprechen zudem gegen eine separate Entwicklung dieser Populationen aus unterschiedlichen Immunreaktionen bzw. gegen eine Spezialisierung auf rein antibakterielle oder rein antivirale Abwehr.



**Abb. 25: CD19<sup>(-)</sup> KM PZ sezernieren tendenziell mehr spezifische IgG-Antikörper gegen Tetanus Toxoid, Mumps oder Masern als CD19<sup>+</sup> KM PZ.** CD19<sup>+</sup> (rot) und CD19<sup>(-)</sup> (blau) KM PZ von fünf Donoren wurden isoliert und sieben Tage lang in RPMI-Medium mit BAFF, APRIL, CXCL12 und IL6 kultiviert. Die Menge der sezernierten IgG-Antikörper, die spezifisch gegen Tetanus Toxoid (A), Mumps (B) oder Masern (C) sind sowie die Menge an Gesamt-IgG (D) in den Überständen wurde anschließend per ELISA bestimmt (2.7). Während die Mengen an sezerniertem Gesamt-IgG in beiden PZ-Populationen ähnlich ausgeprägt sind, weisen CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine tendenziell höhere Sekretionsrate an spezifischen IgG-Antikörpern gegen Tetanus Toxoid, Masern und Mumps auf. Angegeben sind die Messwerte der Proben und zugehörigen Standards und Kontrollen, jeweils als Mittelwerte und Standardabweichungen aus Duplikaten.

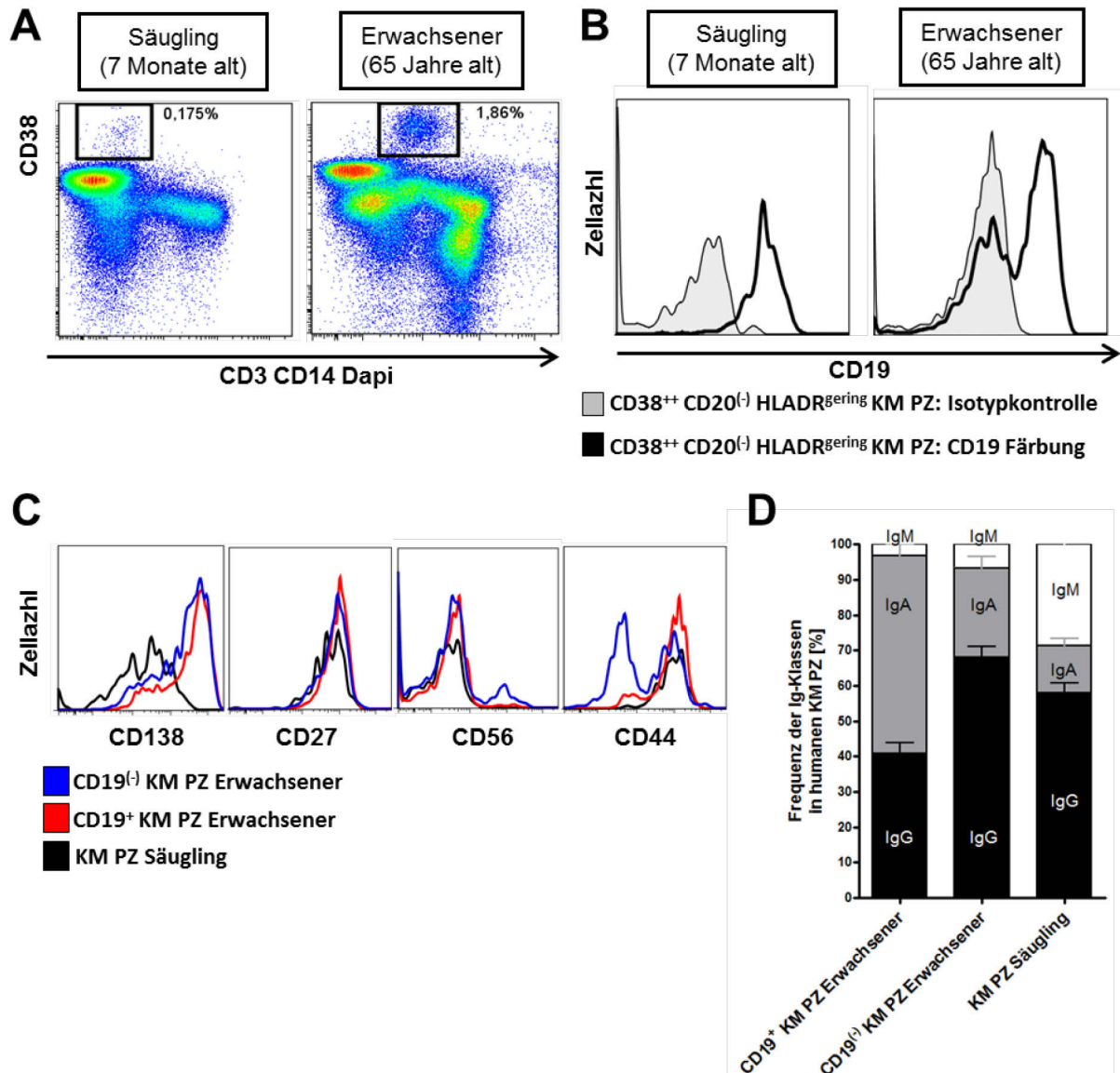
### 3.2.3 Untersuchung von Kinderknochenmark hinsichtlich der CD19-Expression von Plasmazellen

Wie in 1.5 erwähnt, wurde bei der Untersuchung der Mutationsfrequenzen festgestellt, dass CD19<sup>(-)</sup> IgG<sup>+</sup> KM PZ eine geringere Mutationsfrequenz aufweisen als CD19<sup>+</sup> IgG<sup>+</sup> KM PZ. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ während früher Immunantworten entstehen, z. B. im Kindesalter, während CD19<sup>+</sup> KM

PZ erst später durch sekundäre Immunantworten gebildet werden, wenn bereits hochmutierte Gedächtnis-B-Zellen eine erneute Keimzentrumsreaktion durchlaufen und zu PB bzw. PZ differenzieren. Eine Möglichkeit, diese Hypothese zu testen, bot sich in der Untersuchung von KM PZ bei Säuglingen, die im Alter von 5-7 Monaten gemäß der Empfehlung der STIKO bereits einige Grundimmunisierungen durchlaufen haben.

Der Anteil an PZ im Säuglings-KM war wesentlich geringer als bei einem Erwachsenen (Abb. 26A), dennoch konnten neben IgM-PZ bereits klassengewechselte PZ des IgG- und IgA-Isotyps detektiert werden (Abb. 26D). Alle im Säuglings-KM gemessenen  $CD38^{++}$   $CD20^{(-)}$   $HLADR^{gering}$  exprimierenden PZ waren positiv für CD19 (Abb. 26B), zudem zeigten sie eine starke Expression von CD27, eine schwache Expression von CD138 und wiesen ähnlich wie  $CD19^{+}$  KM PZ bei Erwachsenen kein CD56, dafür CD44 auf ihrer Oberfläche auf (Abb. 26C).

Diese Beobachtungen sprechen gegen eine frühe Differenzierung von B-Zellen zu  $CD19^{(-)}$  KM PZ in direkter Linie (ohne eine  $CD19^{+}$  PZ-Zwischenstufe) während primärer Vakzinierungen.



**Abb. 26: KM PZ von Säuglingen exprimieren CD19.** Teile der Schädelknochen von Säuglingen im Alter zwischen fünf und sieben Monaten wurden im Rahmen einer operativen Korrektur von Kraniosynostosen entnommen und mononukleäre Zellen aus dem darin enthaltenen Knochenmark isoliert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung dieser Zellen. Dargestellt sind exemplarische Ergebnisse aus einer von insgesamt drei unabhängigen Analysen. A) Vergleich der PB/PZ-Frequenz im KM von Säuglingen (Schädel) und Erwachsenen (Femurkopf) nach Eingrenzung der mononukleären Zellen auf singuläre Lymphozyten. PB/PZ sind als CD3<sup>(-)</sup> CD14<sup>(-)</sup> Dapi<sup>(-)</sup> CD38<sup>++</sup> Zellen eingegrenzt. Der Anteil an PB/PZ unter Lymphozyten im KM ist bei Säuglingen (hier 0,175%) wesentlich geringer als bei Erwachsenen (hier 1,86%). B) Vergleich der CD19-Expression auf KM PZ von Säuglingen und Erwachsenen. Während augenscheinlich alle KM PZ bei Säuglingen CD19 exprimieren, weisen Erwachsene sowohl eine CD19<sup>+</sup> als auch eine CD19<sup>(-)</sup> KM PZ - Population auf. Dargestellt sind Histogramme der CD19-Färbung (schwarze Linie) und einer Isotypkontrolle (grau schattierte Linie) von CD20<sup>(-)</sup> HLADR<sup>gering</sup> CD38<sup>++</sup> PZ nach Ausschluss von CD3, CD14 und toten Zellen (siehe A). C) Vergleich der Expression der PZ-Marker CD138 und CD27 sowie der Adhäsionsmoleküle CD56 und CD44 auf KM PZ bei Säuglingen (schwarze Linie) und Erwachsenen (CD19<sup>+</sup> PZ rot, CD19<sup>(-)</sup> PZ blau). Im Gegensatz zu CD27 wird CD138 auf KM PZ bei Säuglingen noch nicht in dem hohen Maße exprimiert, wie bei Erwachsenen. Die Expression von CD44 und CD56 auf KM PZ von Säuglingen ist vergleichbar mit dem Expressionsprofil dieser Marker bei CD19<sup>+</sup> KM PZ von Erwachsenen. D) Im KM von Säuglingen sind nicht nur IgM<sup>+</sup> PZ vertreten, sondern auch IgG<sup>+</sup> und IgA<sup>+</sup> PZ. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der drei Ig-Klassen bei KM PZ von Säuglingen (n=3) und CD19<sup>+</sup> sowie CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von Erwachsenen (n=11).

### 3.2.4 Vakzinierungs-Studien zur Untersuchung der CD19-Expression auf Plasmablasten

Wie im vorangegangenen Kapitel erwähnt, ist die geringere Mutationsfrequenz in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ vermutlich nicht mit einer Entstehung dieser Zellen während primärer Immunreaktionen aus weniger stark mutierten Vorläuferzellen zu begründen. Denkbar wäre jedoch, dass CD19<sup>(-)</sup> PB früher aus der Keimzentrumsreaktion austreten als CD19<sup>+</sup> PB und deshalb keine so starke Anhäufung von Mutationen aufweisen.

Da PZ durch die Aktivierung des adaptiven Immunsystems nach dem Zusammentreffen mit Antigenen und der darauf folgenden Immunantwort in sekundären lymphatischen Organen aus reifen B-Zellen oder Gedächtnis-B-Zellen gebildet werden und zunächst als PB aus diesen sekundären lymphatischen Organen auswandern, sodass sie im peripheren Blut detektiert werden können, bevor sie in Zielorgane wie z. B. das Knochenmark oder inflammatorische Stellen einwandern und dort zu reifen PZ ausdifferenzieren, eignen sich Vakzinierungs-Studien besonders gut, um die Entstehung von PB während solcher Immunantworten nachzuvollziehen.

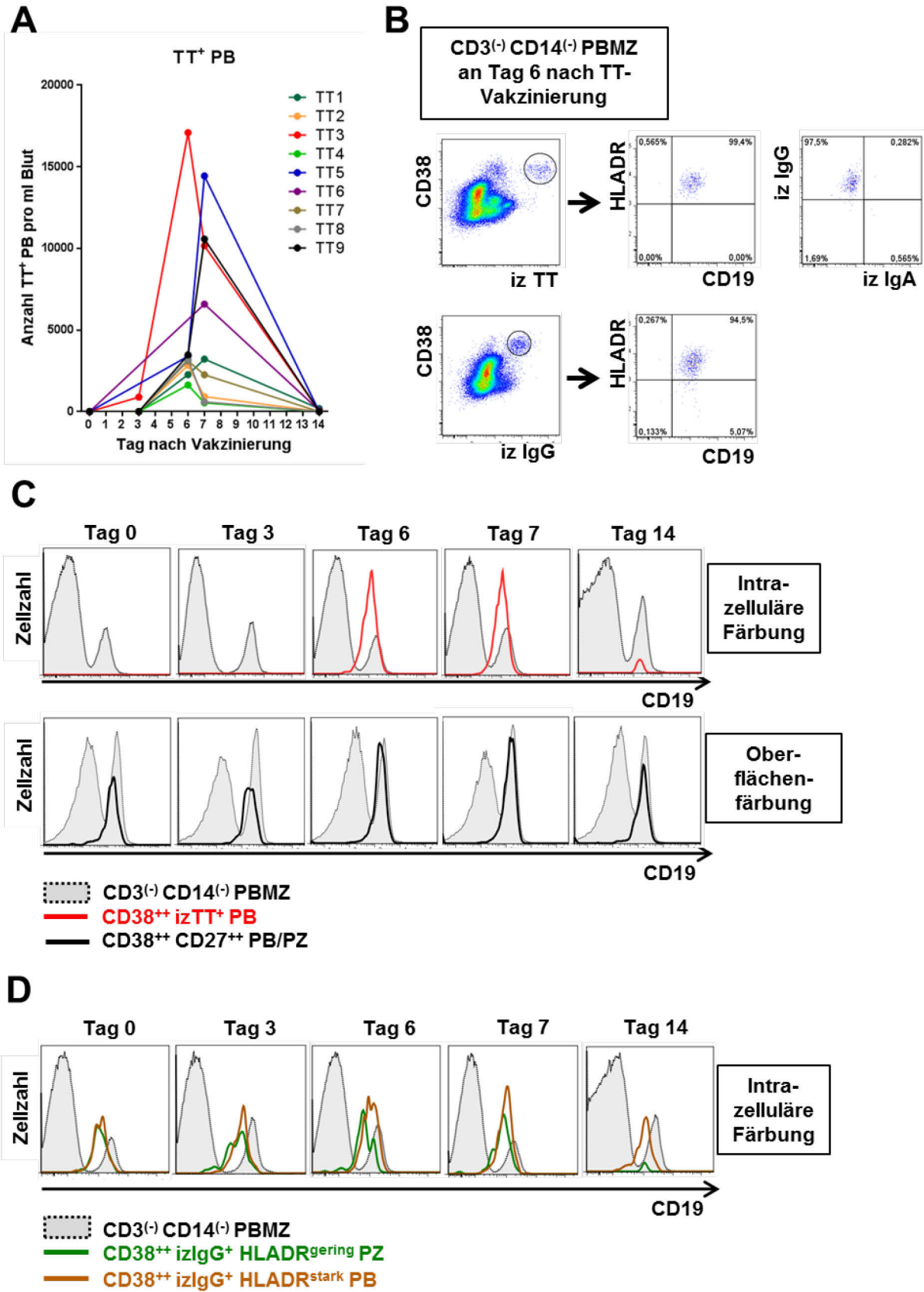
Wie in 3.2.2 dargestellt, finden sich sowohl in der CD19<sup>+</sup> als auch in der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Fraktion spezifische Zellen gegen Tetanus, weshalb eine Tetanus-Vakzinierungsstudie als Modell dafür gewählt wurde, die Entstehung Tetanus-spezifischer PB als Vorläufer von Tetanus-spezifischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nachzuvollziehen. Zudem war dieses Modell im Labor sowohl logistisch als auch technisch etabliert (Frölich et al., 2010; Mei et al., 2009a; Odendahl et al., 2005) und ethisch machbar.

Für die Vakzinierungsstudie wurde der herkömmliche Impfstoff gegen Tetanus/Diphtherie gesunden Probanden intramuskulär verabreicht und sowohl vor der Vakzinierung als auch an mehreren Zeitpunkten während der darauf folgenden zwei Wochen Blut aus der Armvene entnommen, um die mononukleären Zellen des peripheren Blutes durchflusszytometrisch zu analysieren. Da alle Probanden sowohl eine Grundimmunisierung gegen Tetanus im Kindesalter als auch regelmäßige Auffrischimpfungen als Erwachsene erhalten haben, wobei die letzte mindestens sieben Jahre zurück liegen musste, sollte die erneute Immunisierung eine sekundäre Immunantwort bei den Probanden hervorrufen.

Bei allen Donoren konnte etwa eine Woche nach Vakzinierung ein Maximum der Anzahl TT-spezifischer PB im Blut verzeichnet werden, nach zwei Wochen waren diese kaum bzw. nicht mehr im peripheren Blut messbar (Abb. 27A). Die detektierten TT-spezifischen PB exprimierten intrazelluläres IgG und wiesen zu allen gemessenen Zeitpunkten das Oberflächenmolekül CD19 auf (Abb. 27B, C). Auch eine Unterscheidung zwischen HLADR<sup>stark</sup> exprimierenden PB und HLADR<sup>gering</sup> exprimierenden PZ zeigte, dass sowohl die neu generierten PB als auch die reifen PZ, welche im peripheren Blut nach sekundärer Immunisierung nachgewiesen werden können, CD19 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abb. 27D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei einer sekundären Immunantwort keine CD19<sup>(-)</sup> PB im Blut nachgewiesen werden können, sondern CD19<sup>+</sup> PB gebildet werden. Die Hypothese, dass CD19<sup>(-)</sup> PB während solcher Immunreaktionen früher aus dem Keimzentrum austreten als CD19<sup>+</sup> PB, konnte somit ebenfalls nicht bestätigt werden, da auch am Tag 3 nach Vakzinierung keine CD19<sup>(-)</sup> PB detektierbar waren.

Zusammengefasst sprechen die Resultate aus den Untersuchungen der Antigen-Spezifitäten von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, die Beobachtungen aus den Kinder-KM-Proben sowie die Vakzinierungs-Studie gegen eine dichotome Entwicklung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, sondern lassen vermuten, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ *in situ* aus CD19<sup>+</sup> KM PZ entstehen.



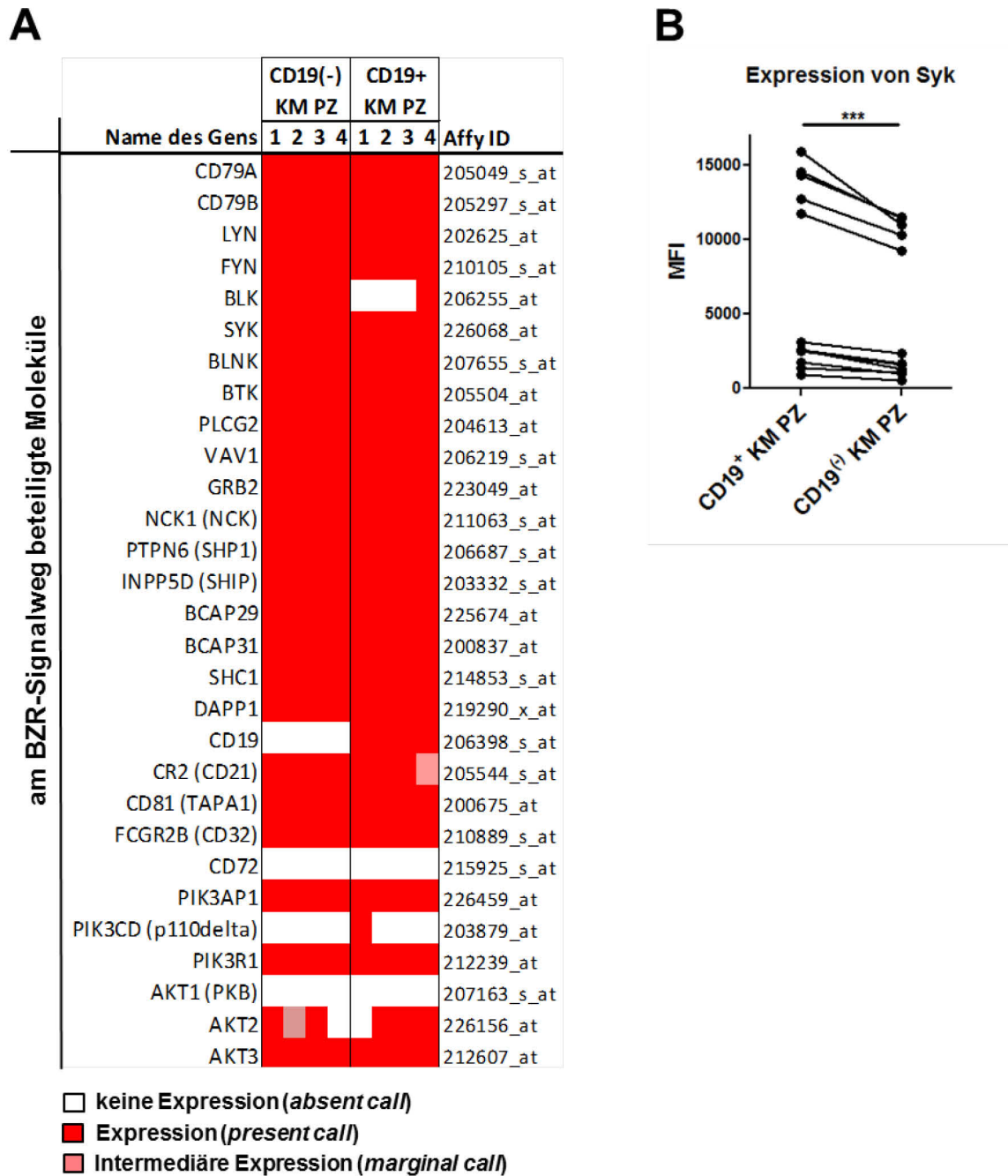


**Abb. 27 (umseitig): Nach sekundärer Vakzinierung mit Tetanus Toxoid (TT) generierte PB exprimieren CD19.** Gesunde Probanden (TT1-9) wurden intramuskulär mit Impfstoff gegen Tetanus und Diphtherie (TT/Diph) vakzinert. Vor der Impfung und an Tag 3, 6, 7 und 14 nach Vakzinierung wurde jeweils Blut aus der Armvene entnommen. Nach Isolation der mononukleären Zellen (PBMZ) wurden diese durchflusszytometrisch untersucht. A) Kinetik der absoluten Zellzahl von  $TT^+$  PB aller neun Probanden. B) Exemplarische Darstellung des Expressionsprofils von  $CD38^{++}$  PB/(PZ).  $CD38^{++}$   $izTT^+$  PB waren  $CD19^+$  (99,4%)  $HLADR^{stark}$  (100%) und  $izIgG^+$  (97,8%). Eine Eingrenzung auf  $CD38^{++}$   $izIgG^+$  PB/(PZ) zeigte ebenfalls eine Expression von  $CD19^+$  (99,6%) und  $HLADR^{stark}$  (94,8%). C-D) Untersuchung der CD19-Expression auf  $CD38^{++}$   $izTT^+$  PB (C, rote Linie) und  $CD38^{++}$   $CD27^{++}$  PB/PZ (C, schwarze durchgezogene Linie) sowie  $CD38^{++}$   $izIgG^+$   $HLADR^{stark}$  PB (D, braune Linie) und  $CD38^{++}$   $izIgG^+$   $HLADR^{gering}$  PZ (D, grüne Linie) im Verlauf der sekundären Immunantwort nach Vakzinierung mit TT/Diph.  $CD3^{(-)}$   $CD14^{(-)}$  PBMZ sind als grau schattierte, gestrichelte Linie abgebildet. Dargestellt sind exemplarische Histogramme aus der Analyse eines von neun Probanden.

### 3.2.5 BZR-Stimulation von KM PZ

Um die Möglichkeiten zu erforschen, wie  $CD19^+$  KM PZ *in situ* in  $CD19^{(-)}$  KM PZ differenzieren könnten, wurde dem B-Zell-Rezeptor (BZR) besondere Aufmerksamkeit gewidmet, auch aufgrund der Beziehung des BZR zur CD19-Expression (siehe 1.4). Da eine Stimulation des BZR auf reifen B-Zellen zusammen mit weiteren kostimulatorischen Signalen die Differenzierung dieser Zellen zu Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmazellen einleitet, wäre es möglich, dass eine erneute Stimulation des BZR auf  $CD19^+$  PZ ebenfalls eine Signalwirkung entfaltet, die zur End-Differenzierung dieser Zellen in  $CD19^{(-)}$  KM PZ führt. Das Vorhandensein eines BZR auf der Oberfläche reifer  $CD19^+$  KM PZ wurde schon in der Vergangenheit gezeigt (Liesegang et al., 1978; Pinto et al., 2013), jedoch nie auf eine mögliche weitere Differenzierung dieser Zellen bezogen.

Zunächst wurde daher überprüft, ob die intrazellulären Moleküle, die für eine Signalweiterleitung des BZR erforderlich sind, auch in KM PZ exprimiert werden. Hierzu wurden die Genexpressionsdaten von  $CD19^+$  und  $CD19^{(-)}$  KM PZ auf das Vorhandensein der entsprechenden Transkripte hin untersucht. Die Zusammenstellung der beteiligten Proteine erfolgte anhand von Primärliteratur (siehe Kapitel 1.4 und S. 163). Es zeigte sich, dass alle für den BZR-Signalweg essentiellen Moleküle sowohl in  $CD19^+$  als auch in  $CD19^{(-)}$  KM PZ exprimiert werden (Abb. 28A). Zusätzlich wurden die Genexpressionsdaten für die Tyrosinkinase Syk exemplarisch für andere Signaltransduktionsmoleküle auch durchflusszytometrisch verifiziert, wobei festgestellt werden konnte, dass unphosphoryliertes Syk in  $CD19^+$  KM PZ stärker vorhanden ist als in  $CD19^{(-)}$  KM PZ (Abb. 28B). Somit schienen die Voraussetzungen für eine potenzielle Signalweiterleitung nach Stimulation des BZR auf PZ gegeben.

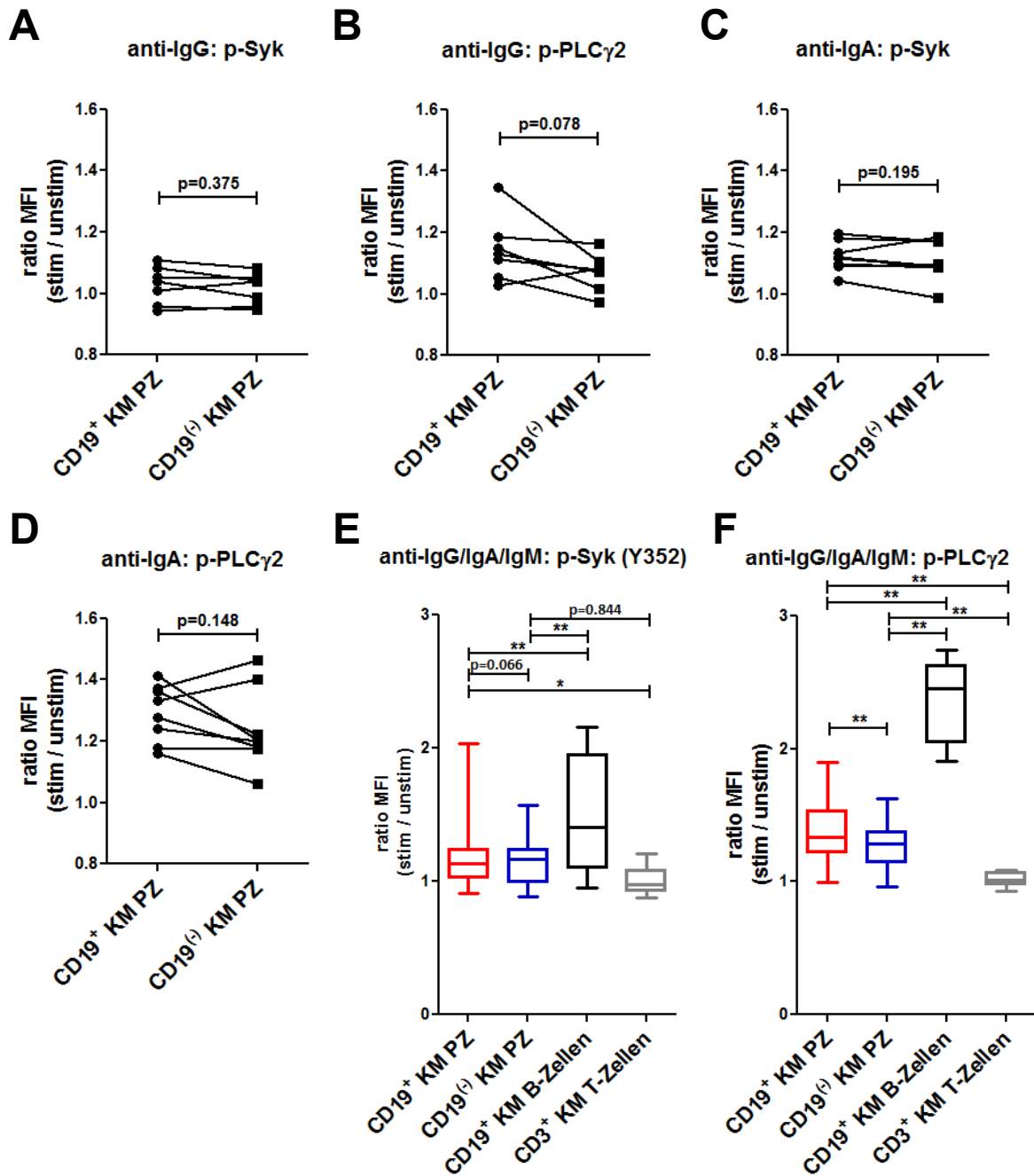


**Abb. 28: CD19<sup>+</sup> KM PZ und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ exprimieren Moleküle, die am Signalweg des B-Zell-Rezeptors (BZR) beteiligt sind.** A) Affymetrix-Genexpressionsanalyse von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren (vgl. 2.11 und 3.1.3) zeigt die Anwesenheit der Transkripte aller relevanten Moleküle des BZR-Signalwegs. Dargestellt sind jeweils *present call* (rot), *absent call* (weiß) oder *marginal call* (rosa) der untersuchten Signalmoleküle in CD19<sup>+</sup> KM PZ und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ der vier Donoren. Zusätzlich sind die Affymetrix-IDs angegeben, deren Signalwerte für die Erstellung dieser Grafik verwendet wurden. B) Durchflusszytometrische Untersuchung von Gesamt-KM-Zellen im Grundzustand (2.5.6) zeigt eine starke Expression von Syk in beiden KM PZ Populationen, wobei CD19<sup>+</sup> KM PZ eine signifikant höhere MFI aufweisen als CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. n=11, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; \*\*\*, p<0,001.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob eine Stimulation des BZR den Signalweg auch wirklich aktiviert, d. h. ob eine Signalweiterleitung stattfindet. Dies kann durchflusszytometrisch anhand des Phosphorylierungsgrades der Signalmoleküle gemessen werden.

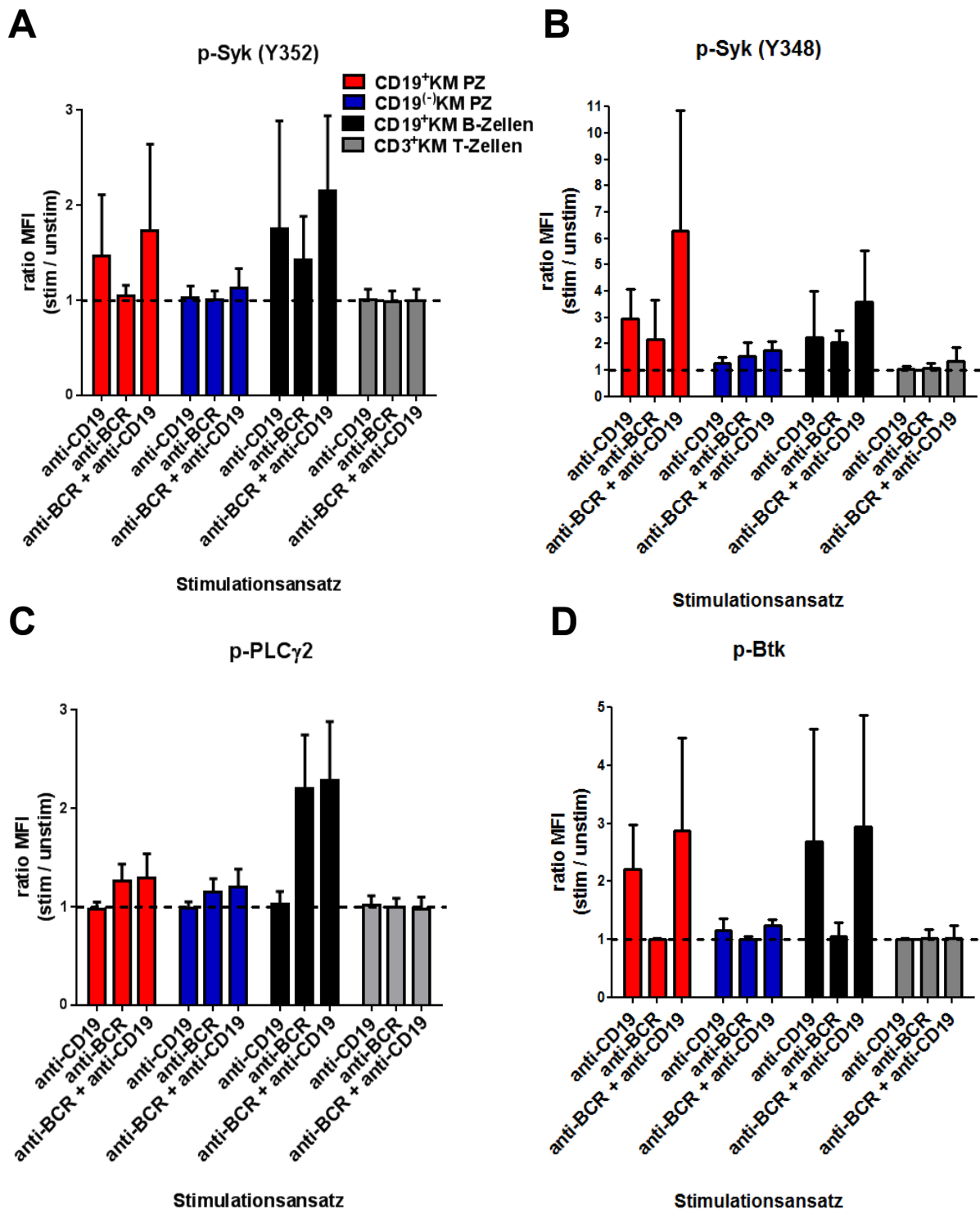
Stimulation von KM PZ mit Anti-IgG-Antikörpern bewirkte eine geringe Phosphorylierung von Syk und eine stärker messbare Phosphorylierung von PLC $\gamma$ 2. Diese Ergebnisse waren sowohl bei CD19<sup>+</sup> als auch bei CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zu beobachten, jedoch ohne signifikante Unterschiede (Abb. 29A, B). Stimulation mit Anti-IgA-Antikörpern brachte ähnliche Resultate, allerdings mit einem etwas höheren Ausmaß der Phosphorylierung von Syk und PLC $\gamma$ 2 (Abb. 29C, D). Da die Ergebnisse der separaten Anti-IgG- bzw. Anti-IgA-Stimulation insgesamt vergleichbar waren, wurde für Folgeexperimente zur Stimulation des BZR eine Mischung aus Anti-IgG-, Anti-IgA- und Anti-IgM-Antikörpern (im Folgenden auch als Anti-BZR bezeichnet) verwendet, um zunächst möglichst alle KM PZ zu stimulieren. Bei Stimulation mit dem Anti-BZR-Mix konnte eine Phosphorylierung von Syk sowohl in CD19<sup>+</sup> als auch in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ in ähnlicher Ausprägung beobachtet werden. Die Phosphorylierungsrate von PLC $\gamma$ 2 war jedoch in CD19<sup>+</sup> KM PZ signifikant höher als in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. In jedem Fall lag die Stimulierbarkeit von KM PZ deutlich unter der von KM B-Zellen, aber dennoch über der von KM T-Zellen, welche bei jeder Analyse als Negativkontrolle mitgeführt wurden (Abb. 29E, F).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der BZR auf KM PZ funktionell ist und eine BZR-Stimulation auch in diesen Zellen die Phosphorylierung intrazellulärer Signaltransduktionsmoleküle bewirkt, wenngleich der beobachtete Effekt nicht so stark ausgeprägt ist wie in B-Zellen.



**Abb. 29: B-Zell-Rezeptor-Stimulation führt zur Phosphorylierung intrazellulärer Signalmoleküle in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>-</sup> KM PZ.** Mononukleäre Zellen aus KM wurden isoliert und 5 min in RPMI-Medium bei 37°C mit Antikörpern gegen den auf der Zelloberfläche exprimierten B-Zell-Rezeptor (BZR) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker und phosphorylierte Signalmoleküle gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (2.9.1). Dargestellt ist jeweils der Quotient aus mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) einer stimulierten Probe und einer zugehörigen unstimulierten Kontrolle. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ . A-D) Stimulation mit Anti-IgG-Antikörper (A, B) oder Anti-IgA-Antikörper (C, D) zeigt einen ähnlichen Phosphorylierungsgrad von Syk (Y352, A, C) und PLC $\gamma$ 2 (B, D) in CD19<sup>+</sup> KM PZ und in CD19<sup>-</sup> KM PZ. E-F) Bei Stimulation mit einem Mix aus Anti-IgG-, Anti-IgA- und Anti-IgM-Antikörpern wird Syk (Y352) in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>-</sup> KM PZ ähnlich stark phosphoryliert (E), während PLC $\gamma$ 2 in CD19<sup>+</sup> KM PZ eine stärkere Phosphorylierung aufweist als in CD19<sup>-</sup> KM PZ (F). Die Phosphorylierungsgrade von Syk und PLC $\gamma$ 2 in CD19<sup>+</sup> KM PZ (rot) und CD19<sup>-</sup> KM PZ (blau) liegen dabei höher als in den als Negativkontrolle mitgeführten KM T-Zellen (grau), jedoch nicht so hoch wie bei KM B-Zellen (schwarz). Dargestellt sind Box-Whisker-Plots aus insgesamt 21 Experimenten.

Als weiterer Schritt sollte die Rolle von CD19 als potenzieller Rezeptor für die Stimulierbarkeit von KM PZ analysiert werden. In B-Zellen verstärkt CD19 in einem Komplex mit CD21 und CD81 die Signale bei einer BZR-Stimulation (siehe 1.4.2). Da auch in CD19<sup>+</sup> KM PZ die Expression von CD21 und CD81 nachgewiesen werden konnte (siehe 3.1.4.3), stellte sich nun die Frage, ob auch in KM PZ dieser Rezeptor-Komplex einen kostimulatorischen Effekt bewirkt.

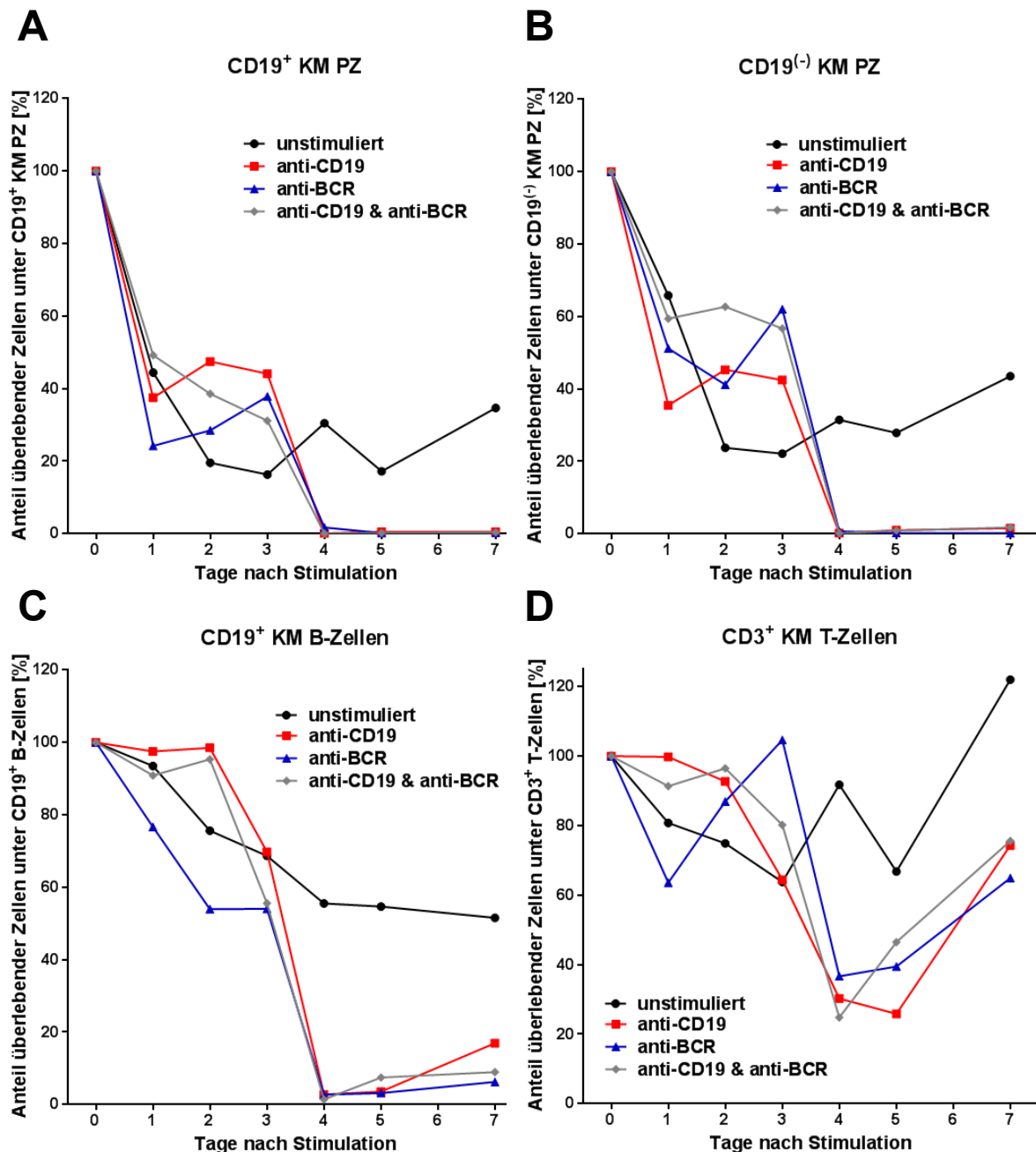


**Abb. 30 (umseitig): Stimulation von CD19 verstärkt die Wirkung einer B-Zell-Rezeptor-Stimulation auf den Phosphorylierungsgrad von Syk und Btk, nicht jedoch PLC $\gamma$ 2 in CD19<sup>+</sup> KM PZ.** Mononukleäre Zellen aus KM wurden isoliert und 5 min in RPMI-Medium bei 37°C mit Anti-CD19-Antikörper (SJ25C1) und/oder einem Mix aus Anti-IgG/IgA/IgM-(Anti-BCR)-Antikörpern stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker und phosphorylierte Signalmoleküle gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (2.9.1). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Ratio MFI (Quotient aus mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) einer stimulierten Probe und einer zugehörigen unstimulierten Kontrolle) für CD19<sup>+</sup> KM PZ (rot), CD19<sup>-</sup> KM PZ (blau), CD19<sup>+</sup> KM B-Zellen (schwarz) und CD3<sup>+</sup> KM T-Zellen (grau). A) Während Stimulation des BZR allein nur eine geringe Phosphorylierung von Syk (Y352) in KM PZ und B-Zellen bewirkt, zeigt sich nach Stimulation von CD19 eine starke Syk-Phosphorylierung sowohl in KM B-Zellen als auch in CD19<sup>+</sup> KM PZ. Eine kombinierte Stimulation von CD19 und BZR weist die höchste Phosphorylierungsrate in diesen Zell-Populationen auf. n=9. B, D) Der in A) beobachtete Effekt zeigte sich auch bei der Analyse der Phosphorylierung von Syk (Y348, B, n=3) und Btk (D, n=2). C) Im Gegensatz zu Syk und Btk wird PLC $\gamma$ 2 nach alleiniger CD19-Stimulation in allen vier untersuchten Zell-Populationen nicht phosphoryliert, sondern erst nach Stimulation des BZR. n=9.

Hierzu wurden KM PZ mit einem agonistisch wirkenden Anti-CD19-Antikörper stimuliert, allein oder in Kombination mit Anti-BZR-Antikörpern. Der Phosphorylierungsgrad der intrazellulären Signalmoleküle sollte dabei abermals Aufschluss über das Maß der Stimulation geben.

Dabei zeigte sich, dass Stimulation von CD19 alleine bereits eine starke Phosphorylierung von Syk in CD19<sup>+</sup> KM PZ bewirkte, und zwar sowohl an der Phosphorylierungsstelle Y352 als auch an Y348. Der Phosphorylierungsgrad lag wesentlich höher als bei alleiniger Stimulation des BZR und konnte bei gleichzeitiger Stimulation von CD19 und BZR noch verstärkt werden. Wie zu erwarten, konnte dieser Effekt in CD19<sup>-</sup> KM PZ nicht beobachtet werden (Abb. 30A, B). Interessanterweise hatte die Stimulation von CD19 keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von PLC $\gamma$ 2 (Abb. 30C). Hier reproduzierten die Analysen die Ergebnisse der vorherigen Versuche (Abb. 29F).

Da der durch CD19-Stimulation aktivierte Signalweg nach Phosphorylierung von Syk und weiteren Molekülen auch in eine Phosphorylierung von Btk münden kann, wurde überprüft, ob die Stimulation von CD19 auch in KM PZ in einer entsprechenden Btk-Phosphorylierung resultiert. Tatsächlich konnte in CD19<sup>+</sup> KM PZ eine starke Btk-Phosphorylierung nach CD19-Stimulation gemessen werden, im Gegensatz zu CD19<sup>-</sup> KM PZ und zu einer Stimulation des BZR alleine. Der Phosphorylierungsgrad von Btk konnte durch kombinierte Stimulation von CD19 und BZR in CD19<sup>+</sup> KM PZ erhöht werden und zeigte ähnliche Dimensionen wie in KM B-Zellen (Abb. 30D).



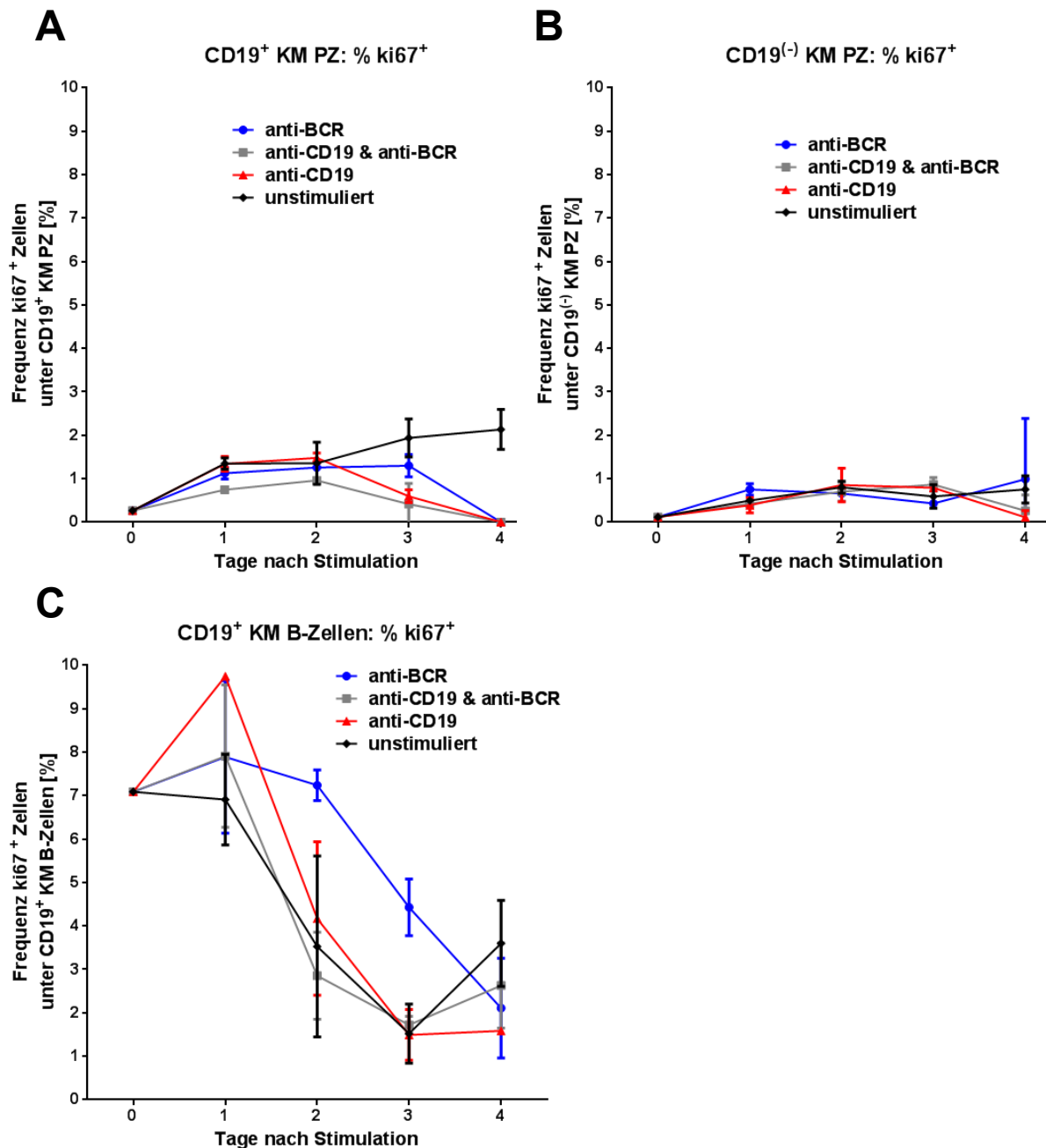
**Abb. 31: Stimulation mit Anti-CD19- und/oder Anti-BCR-Antikörpern reduziert die Überlebenskapazität von KM-Zellen *in vitro*.** Mononukleäre Zellen aus Knochenmark wurden isoliert, in RPMI-Medium mit Anti-CD19-Antikörper (SJ25C1, rote Linie), einem Mix aus Anti-IgG/IgA/IgM-(Anti-BCR)-Antikörpern (blaue Linie) oder einer Kombination beider Stimulanzen (graue Linie) bei 37°C stimuliert und anschließend für sieben Tage bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (schwarze Linie), die zu ansonsten gleichen Bedingungen mitgeführt wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen aus der Kultur entnommen, mit Antikörpern sowie mit Dapi gefärbt und der Anteil überlebender Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (2.9.2). Während die Zahl lebender Zellen in der unstimulierten Kontrolle bei allen vier gemessenen Zell-Populationen am höchsten bleibt, bewirkt sowohl eine CD19-Stimulation als auch eine BZR-Stimulation der Zellen eine starke Reduktion der überlebenden Zellen ab Tag 4 der Zellkultur. Dies gilt sowohl für BZR- und CD19-exprimierende Zellen, als auch für CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und die als zusätzliche Kontrolle analysierten T-Zellen. Dargestellt ist der exemplarische Kulturverlauf von CD19<sup>+</sup> KM PZ (A), CD19<sup>(-)</sup> KM PZ (B), CD19<sup>+</sup> KM B-Zellen (C) und CD3<sup>+</sup> KM T-Zellen (D) als Mittelwert aus Triplikaten aus einem von zwei unabhängigen Experimenten.

Um der Frage nachzugehen, ob und welchen funktionellen Effekt die Stimulation von BZR und CD19 auf KM PZ ausübt und ob eine Differenzierung von CD19<sup>+</sup> in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nach BZR-Stimulation möglich ist, wurden Zellkulturversuche angeschlossen, in denen das Verhalten der Zellen nach Stimulation analysiert werden sollte.

Hierfür wurden mononukleäre Zellen aus KM-Proben isoliert, in Kultur genommen und mit Anti-BZR-Antikörpern und/oder Anti-CD19-Antikörper stimuliert. Wie schon in 3.2.1 beobachtet, war zwischen Tag 0 und Tag 1 der Kultur ein starker Verlust vitaler CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ in allen Ansätzen zu verzeichnen. Bis zum dritten Tag stabilisierten sich die Zahlen lebendiger PZ in stimulierten Konditionen zunächst, jedoch konnten ab dem vierten Tag der Kultur so gut wie keine vitalen PZ mehr in den Ansätzen detektiert werden, in denen die Zellen zuvor stimuliert worden waren. Dies galt sowohl für CD19<sup>+</sup> als auch für CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. In der unstimulierten Kontrolle waren hingegen auch eine Woche nach Beginn der Zellkultur noch lebendige PZ nachweisbar (Abb. 31A, B). Der abrupte Rückgang vitaler Zellen in den stimulierten Ansätzen zwischen Tag 3 und 4 der Zellkultur konnte auch in der B-Zell-Fraktion und z. T. in der T-Zell-Fraktion verzeichnet werden. Hier schien eine Stimulation mit CD19 zunächst eine antiapoptotische Wirkung zu haben, nichtsdestotrotz waren im Gegensatz zur unstimulierten Kontrolle ab dem vierten Tag nach Stimulation kaum noch B-Zellen nachweisbar (Abb. 31C). Ein ähnlicher Verlauf wurde auch in der T-Zell-Fraktion beobachtet, die als Negativkontrolle mitgemessen wurde. Zwar war das Maß der Apoptose in den T-Zellen nicht so stark ausgeprägt wie in PZ oder B-Zellen, jedoch lagen auch hier die Frequenzen überlebender Zellen ab Tag 4 der Zellkultur bei stimulierten Konditionen deutlich unter der unstimulierten Kontrolle (Abb. 31D).

Da eine BZR-Stimulation gemeinsam mit weiteren kostimulatorischen Signalen eine Proliferation von B-Zellen bewirken kann, sollte untersucht werden, ob auch reife nichtproliferierende PZ durch eine entsprechende Stimulation erneut in einen aktiven Zellzyklus übertreten können, denn schließlich würde dies die Möglichkeit einer weiteren Differenzierung der PZ implizieren. Folglich wurde während der oben beschriebenen Zellkultur mononukleärer KM-Zellen nach Stimulation mit Anti-BZR und/oder Anti-CD19 auch die Expression von Ki67 als Marker proliferierender Zellen bestimmt. Im Verlauf der Zellkultur blieb der Anteil Ki67<sup>+</sup> Zellen jedoch bei allen verwendeten Kulturbedingungen sowohl in der CD19<sup>(-)</sup> als auch in der CD19<sup>+</sup> KM PZ Fraktion unter 2% (Abb. 32A, B) und damit im Rahmen dessen, was zuvor schon in KM-Proben *ex vivo* gemessen wurde (Abb. 15). Ein Anstieg proliferierender Zellen nach BZR- und/oder CD19-Stimulation konnte in KM PZ somit nicht verzeichnet werden.

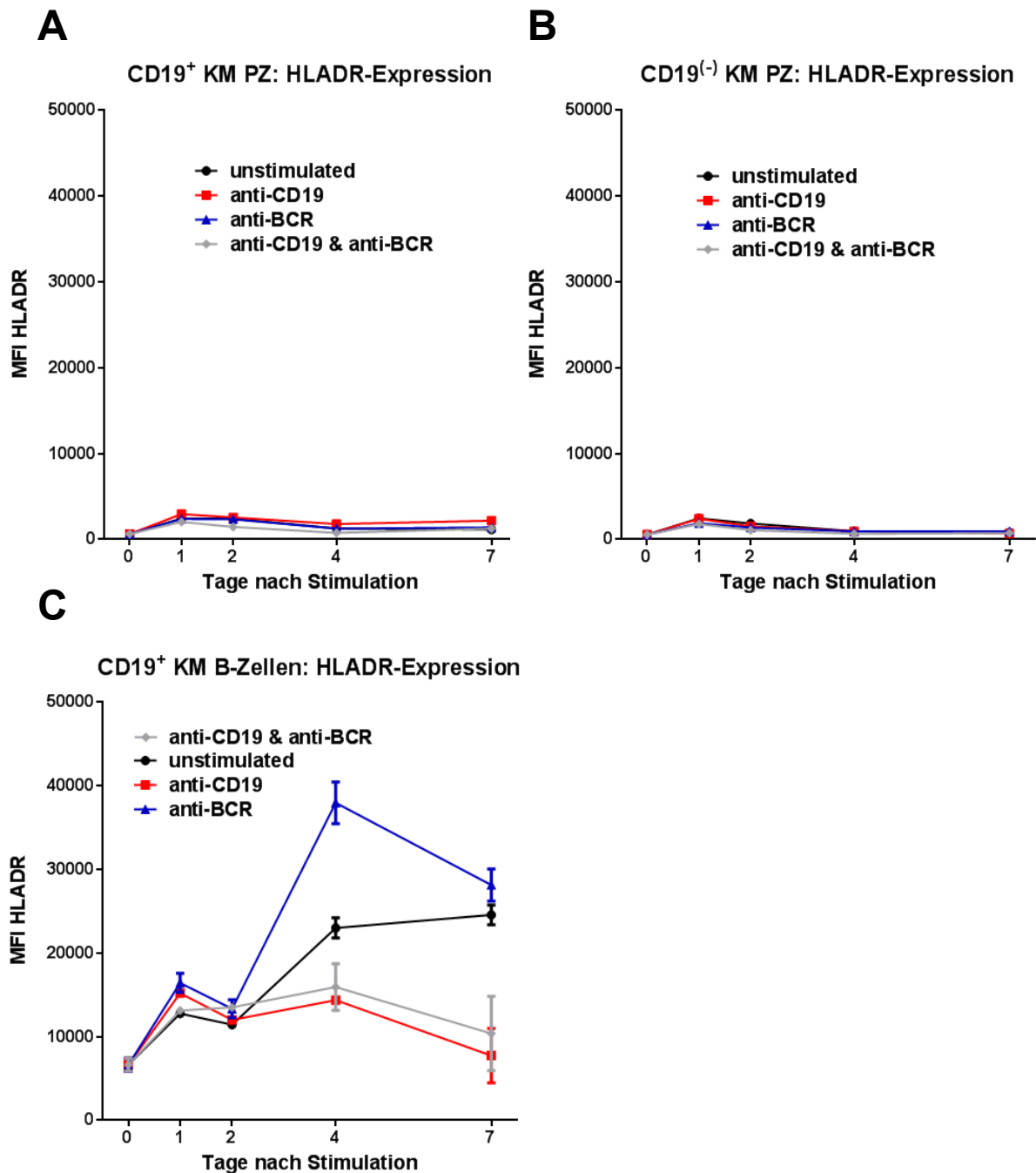




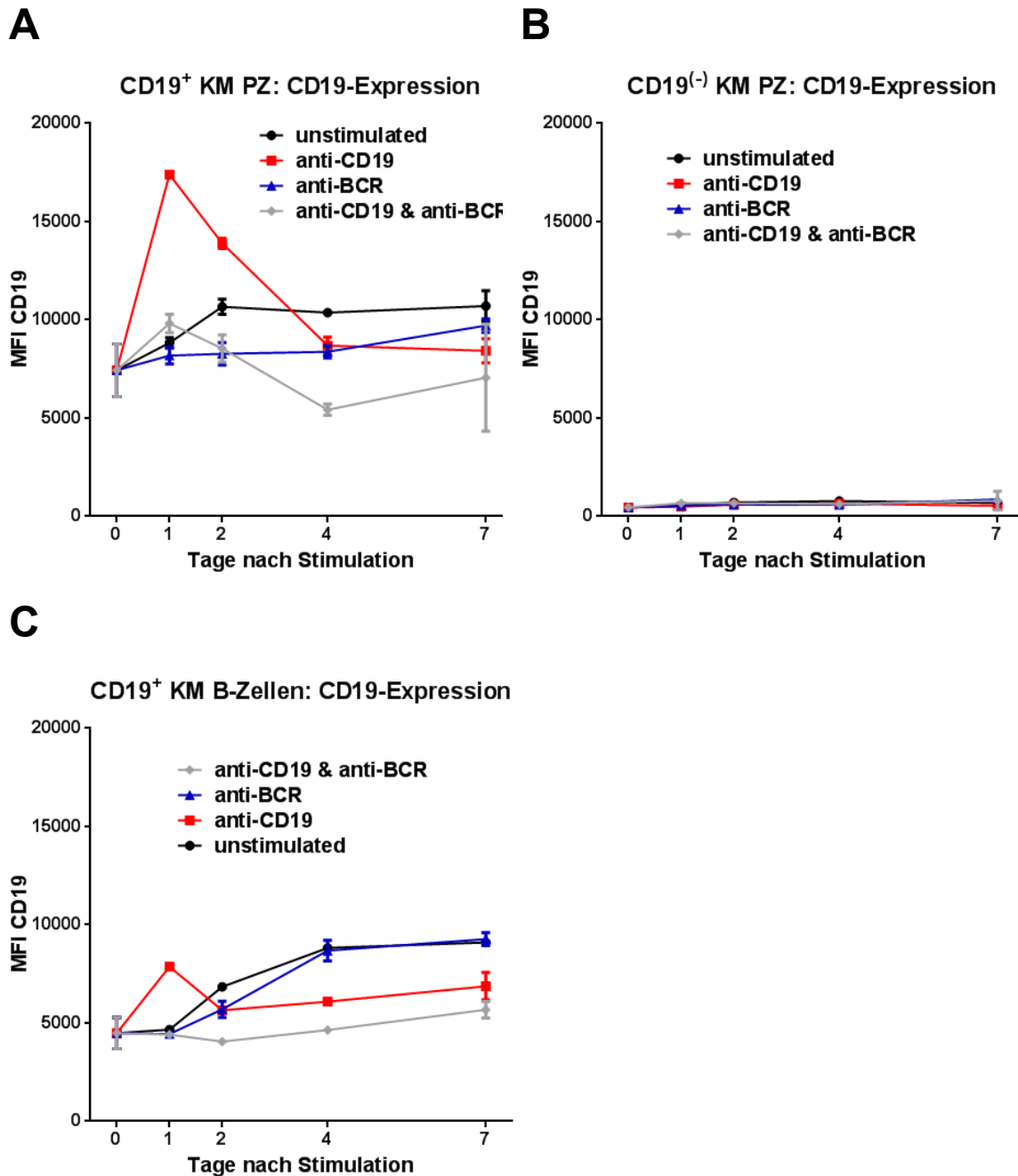
**Abb. 32: Stimulation mit Anti-CD19- und/oder Anti-BCR-Antikörpern hat keinen Einfluss auf die Ki67-Expression von KM-Zellen.** Mononukleäre Zellen aus Knochenmark wurden isoliert, in RPMI-Medium mit Anti-CD19-Antikörper (SJ25C1, rote Linie), einem Mix aus Anti-IgG/IgA/IgM-(Anti-BCR)-Antikörpern (blaue Linie) oder einer Kombination beider Stimulanzien (graue Linie) bei 37°C stimuliert und anschließend für sieben Tage bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (schwarze Linie), die zu ansonsten gleichen Bedingungen mitgeführt wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen aus der Kultur entnommen, intrazellulär gegen Ki67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Frequenz Ki67<sup>+</sup> Zellen unter CD19<sup>+</sup> KM PZ (A), CD19<sup>(-)</sup> KM PZ (B) und CD19<sup>+</sup> KM B-Zellen (C) als Mittelwert mit Standardabweichung von Triplikaten aus einem von zwei unabhängigen Experimenten.

Eine Stimulation Antigen-präsentierender Zellen bewirkt u. a. auch eine verstärkte Expression des MHC-II-Moleküls HLADR (Arita et al., 2008), weshalb besonderes Augenmerk während der Zellkultur auf dieses Oberflächenprotein gerichtet wurde. Im Verlauf der Kultur konnte jedoch weder bei CD19<sup>(-)</sup> noch bei CD19<sup>+</sup> KM PZ eine Veränderung der HLADR-Expression detektiert werden. Beide Populationen zeigten

eine konstant geringe Expression dieses Markers (Abb. 33A, B), die deutlich unter derjenigen von CD19<sup>+</sup> KM B-Zellen lag (Abb. 33C).



**Abb. 33: HLADR-Expression auf KM-Zellen bleibt nach Stimulation mit Anti-CD19- und/oder Anti-BCR-Antikörpern unverändert.** Mononukleäre Zellen aus Knochenmark wurden isoliert, in RPMI-Medium mit Anti-CD19-Antikörper (SJ25C1, rote Linie), einem Mix aus Anti-IgG/IgA/IgM-(Anti-BCR)-Antikörpern (blaue Linie) oder einer Kombination beider Stimulanzen (graue Linie) bei 37°C stimuliert und anschließend für sieben Tage bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (schwarze Linie), die zu ansonsten gleichen Bedingungen mitgeführt wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen aus der Kultur entnommen, gegen HLADR gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von HLADR auf CD19<sup>+</sup> KM PZ (A), CD19<sup>(-)</sup> KM PZ (B) und CD19<sup>+</sup> KM B-Zellen (C) als Mittelwert mit Standardabweichung von Triplikaten aus einem von zwei unabhängigen Experimenten.

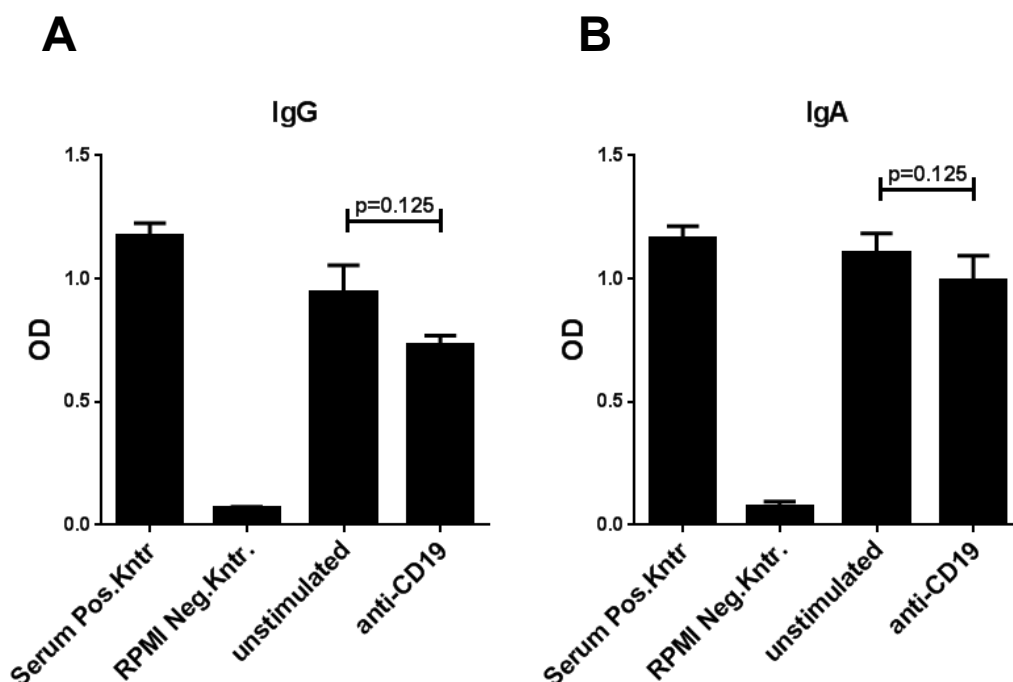


**Abb. 34: CD19-Expression auf KM-Zellen *in vitro* nach Stimulation mit Anti-CD19- und/oder Anti-BCR-Antikörper bleibt langfristig stabil.** Mononukleäre Zellen aus Knochenmark wurden isoliert, in RPMI-Medium mit Anti-CD19-Antikörper (SJ25C1, rote Linie), einem Mix aus Anti-IgG/IgA/IgM-(Anti-BCR)-Antikörpern (blaue Linie) oder einer Kombination beider Stimulanzen (graue Linie) bei 37°C stimuliert und anschließend für sieben Tage bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (schwarze Linie), die zu ansonsten gleichen Bedingungen mitgeführt wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen aus der Kultur entnommen, mit Anti-CD19-Antikörpern (die zuvor auch für die CD19-Stimulation verwendet wurden) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD19 auf CD19<sup>+</sup> KM PZ (A), CD19<sup>(-)</sup> KM PZ (B) und CD19<sup>+</sup> KM B-Zellen (C) als Mittelwert mit Standardabweichung von Triplikaten aus einem von zwei unabhängigen Experimenten.

Schließlich sollte überprüft werden, ob die Stimulation von CD19<sup>+</sup> KM PZ über den BZR mit oder ohne Kombination einer CD19-Stimulation eine Differenzierung in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ bewirkt. Hierfür wurde die Expression von CD19 im Kulturverlauf

verfolgt. Eine CD19-Stimulation führte in CD19<sup>+</sup> KM PZ zu einem kurzzeitigen Anstieg der Dichte dieses Rezeptors auf der Zelloberfläche, jedoch konnte unter keinen der getesteten Stimulationsbedingungen ein Verlust der CD19-Expression auf CD19<sup>+</sup> KM PZ beobachtet werden (Abb. 34A). CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zeigten wie erwartet im gesamten Kulturverlauf keine Expression von CD19, unabhängig von der Stimulation (Abb. 34B). Auch auf B-Zellen blieb die CD19-Expression in diesem Zellkulturversuch relativ konstant (Abb. 34C). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine BZR-Stimulation weder alleine noch in Kombination mit einer CD19-Ligation zu einer Differenzierung von CD19<sup>+</sup> KM PZ in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ führt.

Eine mögliche funktionelle Konsequenz der Stimulation von KM PZ könnte auch die Beeinflussung der Ig-Produktion sein. Deshalb wurden die Überstände aus den oben beschriebenen Zellkulturversuchen zwei Tage nach Stimulation abgenommen und die Menge an sezerniertem Ig mittels ELISA bestimmt. Aufgrund von Kreuzreaktionen des Anti-BZR-Stimulanz mit dem Detektionssystem konnten für diese Analyse nur die Ansätze ausgewertet werden, in denen die Zellen lediglich mit Anti-CD19-Antikörper oder gar nicht stimuliert worden waren. Wenngleich kein signifikanter Unterschied in der Konzentration an IgG oder IgA zwischen stimuliertem und unstimuliertem Ansatz gemessen werden konnte, so zeichnete sich nichtsdestotrotz eine tendenzielle Reduktion der Ig-Produktion bei CD19-Stimulation ab (Abb. 35).



**Abb. 35: Untersuchung des Einflusses einer CD19-Stimulation auf die Ig-Sekretion von KM PZ.** Mononukleäre Zellen aus Knochenmark wurden isoliert, in RPMI-Medium mit Anti-CD19-Antikörper (SJ25C1) stimuliert und 48 h bei 37°C/5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die Menge an sezerniertem IgG (A) bzw. IgA (B) mittels ELISA bestimmt (2.7, 2.9.2). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei KM-Proben sowie die mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ermittelten p-Werte.

Zusammengefasst weisen die Stimulationsdaten von KM PZ darauf hin, dass sowohl CD19<sup>+</sup> als auch CD19<sup>(-)</sup> KM PZ einen funktionellen BZR auf ihrer Oberfläche besitzen, dessen Stimulation in eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege mündet. Die Stimulierbarkeit scheint dabei in CD19<sup>+</sup> KM PZ stärker ausgeprägt zu sein als in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. Auch die Ligation des Ko-Rezeptors CD19 führt in CD19<sup>+</sup> KM PZ zu einer Phosphorylierung von Signaltransduktionsmolekülen, insbesondere von Syk und Btk. Die Auswirkungen einer BZR- oder CD19-Stimulation zeigten sich in einer verstärkten Apoptose der KM PZ und möglicherweise reduzierten Sekretion von Ig. Eine Proliferation von KM PZ nach Stimulation konnte jedoch ebenso wenig festgestellt werden wie eine Veränderung in der Expression von HLADR oder CD19.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Zusammenfassung der Fragestellung und bisherigen Ergebnisse

Um die Bedeutung verschiedener PZ Subpopulationen für die Bildung der humoralen Immunität und den Erhalt des humoralen Gedächtnisses zu analysieren sowie einen Einblick in die PZ Homöostase im humanen KM zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei KM PZ Populationen untersucht, die sich hinsichtlich der Expression von CD19 unterscheiden. Da CD19 durch den Transkriptionsfaktor Pax5 reguliert und Pax5 im Zuge der PZ Differenzierung reprimiert wird (siehe 1.2.4), wäre zu erwarten, dass CD19 von PZ nicht mehr exprimiert wird. Tatsächlich ist dies aber nur bei einem Teil der reifen KM PZ der Fall. Hier stellte sich also die Frage, ob CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ sich hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades unterscheiden. Des Weiteren wäre denkbar, dass sich CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ aus unterschiedlichen Vorläuferzellen entwickeln und somit verschiedene Antigen-Spezifitäten aufweisen, die z. B. eine Spezialisierung der jeweiligen PZ Population auf die Abwehr entweder bakterieller oder viraler Antigene beinhalten. Eine Spezialisierung diverser PZ Populationen auf bestimmte Antigentypen würde erklären, warum sich die Halbwertszeiten antiviraler Antikörper-Titer so stark von denen antibakterieller Antikörper-Titer unterscheiden (Amanna et al., 2007). Ziel dieser Arbeit war folglich eine umfassende molekulare, phänotypische und funktionelle Charakterisierung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.

Die molekularbiologische Untersuchung der beiden KM PZ Fraktionen umfasste die Auswertung von Genexpressionsdaten, welche erste Hinweise darauf lieferten, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ einen höheren Reifegrad und eine potenziell bessere Überlebensfähigkeit besitzen als CD19<sup>+</sup> KM PZ. Beide PZ Populationen wiesen zudem Unterschiede in der Expression von Adhäsions- und Migrationsmolekülen auf. Die Phänotypisierung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ mittels Durchflusszytometrie konnte diese Ergebnisse bestätigen. Die einzelnen Resultate hierzu werden in Kapitel 4.3 detailliert diskutiert.

Um herauszufinden, welche funktionelle Bedeutung den oben erwähnten Unterschieden zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zukommt, wurden funktionelle Analysen durchgeführt, welche darauf abzielten, eine mögliche differenzielle Überlebenskapazität dieser beiden PZ Fraktionen zu überprüfen und einen eventuell unterschiedlichen Beitrag zur humoralen Immunabwehr zu erkennen. Dabei konnte festgestellt werden, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ *in vitro* eine tendenziell bessere Überlebensfähigkeit aufweisen als CD19<sup>+</sup> KM PZ. Zudem stellte sich heraus, dass CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ sich in ihren Antigen-spezifitäten bezüglich Tetanus, Masern, Mumps und EBV ähneln. Zusammen mit der Abwesenheit CD19<sup>(-)</sup> PB/PZ im KM von Säuglingen sowie im Blut nach Vakzinierung gesunder Probanden mit einem Impfstoff gegen Tetanus sprechen diese Ergebnisse dafür, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ

durch graduelle Differenzierung aus CD19<sup>+</sup> KM PZ *in situ* entstehen. Dabei scheinen sich die beiden untersuchten KM PZ Populationen jedoch hinsichtlich ihrer Homöostase zu unterscheiden, weshalb angenommen wird, dass CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ unterschiedliche Rollen für den Erhalt bzw. die Anpassung des humoralen Gedächtnisses übernehmen. Kapitel 4.4 beinhaltet eine umfassende Diskussion und Interpretation dieser Ergebnisse.

## 4.2 Das Knochenmark als Hauptspeicherort CD19<sup>(-)</sup> PZ

Eine Untersuchung der CD19-Expression auf PZ in verschiedenen Geweben ergab, dass das KM eine wesentlich höhere Frequenz und Anzahl an CD19<sup>(-)</sup> PZ aufweist als Milz, Tonsille oder Blut. Zwar konnte bei der Analyse der Blutproben in vereinzelt Fällen ein Anteil an CD19<sup>(-)</sup> PZ von über 25 % beobachtet werden (Abb. 8B), allerdings war hier die Absolutzahl an PZ sehr gering. Insgesamt konnte zudem festgestellt werden, dass bei höheren Absolutzahlen von Gesamt-PZ in Milz, Tonsille und Blut anteilig auch mehr CD19<sup>+</sup> PZ enthalten waren, was sich in der großen Varianz von CD19<sup>+</sup> PZ in diesen Geweben widerspiegelt, während die Absolutzahlen von CD19<sup>(-)</sup> PZ in Milz, Tonsille und Blut bei allen untersuchten Proben sehr niedrig ausfielen und somit eine geringe Streuung aufwiesen. Im Gegensatz zu diesen Geweben waren sowohl Frequenz als auch Absolutzahlen von CD19<sup>(-)</sup> PZ im KM deutlich erhöht (Abb. 8B-C).

Die vorliegenden Daten zum KM stammen allesamt aus Femurkopf-Proben. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass sie ein für KM repräsentatives Bild liefern, da KM-Proben, die aus dem Beckenkamm, dem Sternum oder dem Femurkopf gewonnen wurden, eine vergleichbare Verteilung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> PZ aufwiesen (Mei et al., 2015). Auch eine Verzerrung der Ergebnisse durch das unterschiedliche Alter der Donoren, von denen die Gewebeproben stammen, ist unwahrscheinlich. Zwar stammen die KM-Proben im Gegensatz zu Blut, Milz und Tonsille hauptsächlich von älteren Menschen (Durchschnittsalter 66 Jahre), da das Material im Rahmen von Hüft-TEPs entnommen wurde. Dies ist eine chirurgische Maßnahme, die überwiegend bei älteren Patienten durchgeführt wird, welche an Arthrose leiden oder aufgrund von Traumata ein künstliches Hüftgelenk benötigen. Bei den verwendeten KM-Proben konnte jedoch keine Korrelation des Alters oder des Geschlechts mit der Anzahl und Frequenz von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ festgestellt werden (Abb. 9).

Der Berechnung von Absolutzahlen in den einzelnen Geweben lag die Publikation von Trepel (1974) zugrunde, welche die Zahl und Verteilung von Lymphozyten in Blut und lymphatischen Organen im menschlichen Organismus quantitativ bestimmt. Zwar wurden die Lymphozytenwerte von Trepel für einen männlichen, jungen Erwachsenen von etwa 70 kg Körpergewicht bestimmt und stellen daher eher einen Orientierungswert dar; geht man aber davon aus, dass die Zahl und Verteilung von Lymphozyten im humanen System keinen großen alters- oder geschlechtsbedingten Schwankungen unterliegt, so können die Werte für Extrapolationen bei gesunden Erwachsenen herangezogen werden. Zudem würde sich eine Ungenauigkeit in der

Ermittlung von Absolutzahlen sowohl auf die CD19<sup>+</sup> als auch auf die CD19<sup>(-)</sup> PZ-Fraktion in gleicher Weise auswirken, da den Berechnungen für beide Populationen die jeweils gleiche Lymphozytenzahl zugrunde lag, welche mit dem prozentualen Anteil der CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> PZ verrechnet wurde. Da in der Publikation von Trepel keine separaten Lymphozytenwerte für Tonsillen enthalten sind, sondern Lymphknoten und Tonsillen zusammengefasst wurden, sind die entsprechenden Werte in Abb. 8C ebenfalls als Kalkulation für Lymphknoten und Tonsillen angegeben.

Die erhobenen Daten passen insofern zum aktuellen Stand der Literatur, als dass PZ in sekundären lymphatischen Geweben und im Blut grundsätzlich als CD19<sup>+</sup> beschrieben werden (Brieva et al., 1991; Medina et al., 2002), während das Vorkommen CD19<sup>(-)</sup> PZ im KM bereits in verschiedenen Studien erwähnt wurde, jedoch ohne auf eine mögliche funktionelle Bedeutung der unterschiedlichen CD19-Expression einzugehen (Brieva et al., 1991; Ellyard et al., 2004; Harada et al., 1993; Ishikawa et al., 2002; Liu et al., 2012; Luque et al., 1998; Medina et al., 2002; Peceliunas et al., 2011; Pellat-Deceunynck et al., 1994). Allerdings ist nicht ersichtlich, inwiefern das Vorhandensein CD19<sup>(-)</sup> PZ in sekundären lymphatischen Geweben bisher überhaupt überprüft worden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde folglich zum ersten Mal die Expression von CD19 auf allen PZ in Milz, Tonsille, Blut und KM umfangreich untersucht und quantitativ miteinander verglichen.

Da im Maus-Modell das KM als Hauptspeicherort langlebiger PZ vorgeschlagen wird (Benner et al., 1977; Manz et al., 1997, 1998, 2002 und 2005; Radbruch et al., 2006; Slifka and Ahmed, 1998; Slifka et al., 1995 und 1998) wäre denkbar, dass gerade die CD19<sup>(-)</sup> PZ Population im KM ähnliche Eigenschaften bezüglich Langlebigkeit und Beitrag zum humoralen Gedächtnis leistet wie langlebige KM PZ in der Maus.

Zusammengefasst zeigen die erhobenen Daten eine deutliche Akkumulation von CD19<sup>(-)</sup> PZ im KM und lassen darauf schließen, dass das KM den Hauptspeicherort von CD19<sup>(-)</sup> PZ repräsentiert. Diese Beobachtung begründet, warum bei nachfolgenden Analysen zur Untersuchung und Charakterisierung von CD19<sup>(-)</sup> PZ der Schwerpunkt auf das humane KM gelegt wurde.

### **4.3 Molekularbiologische Charakterisierung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ**

#### **4.3.1 Identifizierung signifikant differenziell exprimierter Gene mittels Genexpressionsanalyse**

##### **4.3.1.1 Technische Einschränkungen des verwendeten Systems**

Um einen Einblick in mögliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zu erhalten und abschätzen zu können, ob diese beiden PZ-Populationen möglicherweise auch funktionell voneinander differenziert werden können, wurden die Daten einer Genexpressionsanalyse, welche zuvor mit dem



Affymetrix-System aus vier Paaren von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ erhoben worden waren und zu Beginn der Doktorarbeit bereits vorlagen, ausgewertet. Eine Genexpressionsanalyse ermöglicht durch die Ermittlung des Transkriptionsstatus mehrerer tausend Gene einen genomweiten Abgleich vorhandener (*present call*) oder nicht transkribierter mRNA (*absent call*) in verschiedenen Zellpopulationen und erlaubt die Feststellung transkriptioneller Unterschiede.

Dem großen Vorteil der raschen Gewinnung großer Datenmengen stehen jedoch auch gewisse technische Beschränkungen gegenüber: Erstens ergibt sich allein aufgrund der enormen Datenmenge die Schwierigkeit, biologisch relevante Unterschiede zu identifizieren und diese von funktionell irrelevanten Abweichungen zwischen den untersuchten Zellpopulationen abzugrenzen. Die ebenfalls durchgeführte Identifikation signifikant differenzieller funktioneller Gruppen mittels DAVID Bioinformatics Resources (Huang da et al., 2009a, b) diente daher dazu, die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach ihrer funktionellen Bedeutung zu filtern.

Zweitens steigt aus statistischen Gründen mit der Anzahl der Datensätze auch die Anzahl falsch-positiver Ergebnisse, die zwar differenziell unterschiedlich exprimiert erscheinen, es jedoch tatsächlich nicht sind. Durch die Verwendung speziell abgestimmter Algorithmen kann bei der Ermittlung signifikant differenziell exprimierter Gene mit der Bioretis-Software die Zahl falsch-positiver Resultate jedoch minimal gehalten werden. Nichtsdestotrotz liefern die Ergebnisse einer Genexpressionsanalyse lediglich einen Hinweis auf mögliche Unterschiede, die anschließend noch auf Proteinebene oder durch funktionelle Analysen verifiziert werden müssen, wie in der vorliegenden Arbeit mittels Durchflusszytometrie und Überprüfung der Überlebensfähigkeit von KM PZ *in vitro* geschehen.

Drittens sollte immer die Möglichkeit einer Kontamination in Erwägung gezogen werden, da trotz größter Umsicht eine 100%-ige Reinheit bei der Isolation der Zellen mit den verwendeten Methoden schwierig zu erreichen ist. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob sich der PZ-Phänotyp in der Expression PZ-typischer Marker widerspiegeln lässt und bestimmte Marker, die charakteristisch für andere Zelllinien sind, in den Transkripten auftauchen (siehe 3.1.3.1, Abb. 38). Anhand dieser Kontrollen kann die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination in der vorliegenden Analyse als minimal angesehen werden.

Viertens liegen der in dieser Arbeit ausgewerteten Genexpressionsanalyse nur vier Probenpaare aus CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zugrunde. Je geringer die Probenanzahl, desto eingeschränkter ist jedoch auch die statistische Aussagekraft. So ist es durchaus möglich, dass bei der Auswertung der erhobenen Daten einige Gene nicht als signifikant differenziell exprimiert erscheinen, obwohl bei einer höheren Probenanzahl die Signifikanz gegeben wäre. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn die Unterschiede in der mRNA-Menge zwar tendenziell konstant, aber nur gering ausfallen. Mehr Probenpaare würden womöglich ein noch deutlicheres Bild der Unterschiede zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zeichnen. Aus Gründen der Verfügbarkeit war es jedoch zum Zeitpunkt der Datenerhebung nicht möglich, die Probenanzahl zu erhöhen. Eine Möglichkeit, dieses statistische Problem zu umgehen

und auch geringfügige Differenzen zwischen den untersuchten Zellpopulationen zu untersuchen, bestand in der Durchführung einer GSEA-Analyse, da hier keine Beschränkung auf zuvor als signifikant eingestufte Gene erfolgt, sondern der gesamte genomweite Datensatz zur Ermittlung transkriptioneller Unterschiede herangezogen wird und somit auch geringfügige Abweichungen berücksichtigt werden. Aufgrund ihrer zum paarweisen Vergleich abweichenden Normalisierung und statistischen Auswertung diente die GSEA zusätzlich einer Validierung der Erkenntnisse aus den mit Bioretis oder DAVID Bioinformatics Resources ermittelten signifikanten Unterschieden zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.

Insgesamt stellt die Genexpressionsanalyse ein geeignetes Mittel dar, um durch einen genomweiten Abgleich der Transkriptionsdaten zweier Zellpopulationen einen Überblick über differenziell exprimierte Gene und somit über möglicherweise unterschiedliche Funktionen dieser Zellpopulationen zu erhalten. Durch Verwendung einer speziell dazu ausgerichteten Auswertungssoftware (BioRetis), der Analyse einer internen Qualitätskontrolle sowie der Verifizierung erhobener Daten durch GSEA-Analyse und Durchflusszytometrie (siehe 4.3.2) können eventuell vorhandene Fehlerquellen als gering angesehen werden.

#### 4.3.1.2 Genexpressionsanalyse liefert Hinweise auf Unterschiede in Differenzierung, Apoptose, Migration und Adhäsion sowie Immunantwort

Die Durchsicht der mit Bioretis erfassten 689 signifikant differenziell exprimierten Gene machte eine Interpretation der Ergebnisse bezüglich der Eigenschaften von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zunächst beschwerlich, da zum einen die biologische Bedeutung einiger Gene noch unbekannt ist, zum anderen die Transkripte vieler Gene unterschiedliche funktionelle Rollen einnehmen können, z. B. durch Beteiligung an verschiedenen Signalwegen. Es fielen jedoch einige Kandidaten ins Auge, die bestimmten, für PZ relevanten biologischen Prozessen zugeordnet werden können, wie z. B. Differenzierung, Apoptose, Zellmigration bzw. Adhäsion (Tabelle 9).

Um die Interpretation der Genexpressionsanalyse zu erleichtern, wurden die signifikant differenziell exprimierten Gene mit Hilfe von DAVID Bioinformatics Resources (Huang da et al., 2009a, b) funktionellen Gruppen zugeordnet. Hier fanden sich unter den statistisch relevantesten Gruppen jene biologischen Prozesse wieder, die bereits zuvor aufgefallen waren, nämlich abermals Differenzierung, Apoptose und Zellmigration, sowie Immunreaktion und unterschiedliche Expression von MHC-Molekülen (Tabelle 10). Aber auch eine differenzielle Regulierung von Signalwegen legt die Identifikation funktioneller Gruppen nahe, da Prozesse wie Modifikation bzw. Phosphorylierung von Proteinen und Enzymen eine hohe Signifikanz im Vergleich von CD19<sup>+</sup> mit CD19<sup>(-)</sup> KM PZ aufwiesen. Da diese Gruppen jedoch sehr grob gefasst sind und die unterschiedlich exprimierten Gene abgesehen vom TGFβ-Signalweg keinem bestimmten zellulären Prozess zugeordnet werden konnten, war eine eindeutige Interpretation dieser Ergebnisse bisher nicht möglich und bedarf weiterer Untersuchungen.

Wie unter 4.3.1.1 erwähnt, wurde zur Validierung der signifikanten Gruppen und zur Berücksichtigung tendenzieller, jedoch im paarweisen Vergleich nicht signifikanter Unterschiede zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine GSEA-Analyse mit dem gesamten Datensatz der Genexpressionsanalyse durchgeführt. Die hierfür verwendeten Gengruppen stammen aus der MSigDB Datenbank und wurden nach Interpretierbarkeit bzw. ihrem Bezug zu Lymphozyten manuell gefiltert, um auch hier das Problem von zu grob gefassten oder zu diversen Gruppen zu vermeiden. Die Ergebnisse der GSEA-Analyse spiegeln die Resultate aus dem paarweisen Vergleich mit Bioretis und der Zuordnung zu funktionellen Gruppen mittels DAVID Bioinformatics Resources wider. Auch hier waren jene Gruppen signifikant angereichert, deren Gene in biologischen Prozessen wie Differenzierung, Apoptose, Zellmigration, Adhäsion und Immunreaktion involviert sind. Die Übereinstimmung der Ergebnisse aus DAVID Bioinformatics Resources und GSEA-Analyse verdeutlicht die hohe Signifikanz der erhaltenen Resultate.

Diese Ergebnisse sind insofern interessant, als dass PZ bisher gemeinhin als enddifferenzierte Zellen gelten, denen kein weiteres Entwicklungspotenzial zugesprochen wird. Die (noch zu überprüfende) Möglichkeit, dass auch reife PZ verschiedene Differenzierungsschritte durchlaufen könnten, würde folglich einen neuen Aspekt in die Biologie von PZ einbringen. Zudem gelten reife PZ allgemein als nicht-migratorisch, was vor allem auf den Erkenntnissen aus Maus-Modellen und *in vitro* Versuchen basiert (Hauser et al., 2002; Mei et al., 2009a). Jedoch ist in einer Studie eine gewisse Migrationsfähigkeit für humane KM PZ nachgewiesen worden (Nakayama et al., 2003), so dass die in der Genexpressionsanalyse ermittelten Unterschiede bezüglich Migrations- und Adhäsionsmarkern tatsächlich dafür sprechen könnten, dass unterschiedliche PZ Populationen auch verschiedene migratorische Eigenschaften aufweisen könnten. Interessant ist auch die Beobachtung, dass sich CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ hinsichtlich ihrer Überlebensfähigkeit unterscheiden könnten, da zwar angenommen wird, dass im KM langlebige PZ lokalisiert sind, diese Langlebigkeit jedoch bisher nicht genauer definiert ist (Manz et al., 1997 und 2005; Radbruch et al., 2006; Slifka and Ahmed, 1998; Slifka et al., 1998). Somit ist denkbar, dass die Lebensdauer von KM PZ zwischen den verschiedenen Subpopulationen differiert.

Zusammengefasst bietet die Auswertung der Genexpressionsanalyse von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Hinweise darauf, dass diese beiden Zellpopulationen Unterschiede in ihrem Reifegrad und ihrer Beteiligung bei der humoralen Immunantwort aufweisen, sowie möglicherweise differenzielle Eigenschaften bezüglich ihrer Ansiedelung und Homöostase in Überlebensnischen des KM besitzen. Da die Genexpressionsanalyse nur die Gegebenheiten auf mRNA-Ebene wiedergibt, bedürfen die hieraus entstandenen Ergebnisse einer Verifizierung auf Proteinebene oder durch funktionelle Studien, was das Ziel der folgenden Schritte in der vorliegenden Doktorarbeit war.

### 4.3.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung des Phänotyps von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ

#### 4.3.2.1 Sowohl CD19<sup>(-)</sup> als auch CD19<sup>+</sup> KM PZ stellen reife PZ-Populationen dar

Ein erster Schritt in der durchflusszytometrischen Charakterisierung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ beinhaltete die Untersuchung typischer Eigenschaften und Marker von PZ. Diese Effektorzellen zeichnen sich in erster Linie durch die Sekretion von Antikörpern aus, welche bereits in früheren Analysen untersucht und für CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ bestätigt worden war (Mei et al., 2015). Durch Anfärben von intrazellulärem Ig konnte verifiziert werden, dass beide KM PZ Populationen starke Expression von CD38 aufweisen, weshalb dieses Oberflächenmolekül bei anschließenden durchflusszytometrischen Experimenten als Identifizierungsmarker verwendet wurde (Mei et al., 2015) (Abb. 7). Basierend auf dieser Färbestrategie wurde nun untersucht, ob CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ phänotypische Unterschiede aufweisen. Dabei konnte zunächst festgestellt werden, dass beide KM PZ Fraktionen eine vergleichbar geringe Granularität besitzen und blastische Zellgröße aufweisen, anhand derer sie durchflusszytometrisch deutlich von den wesentlich kleineren B- und T-Lymphozyten abgegrenzt werden können. Überraschenderweise waren CD19<sup>+</sup> KM PZ jedoch signifikant größer als CD19<sup>(-)</sup> KM PZ (Abb. 12). Während der Differenzierung von B-Zellen zu PB nimmt die Zellgröße aufgrund der Umstellung zur Antikörperproduktion und –sekretion zu, da durch die sekretorischen Prozesse und der damit verbundenen hohen Aktivität des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparats sowie zur Speicherung der Vesikel im Zytoplasma ein größeres Zellvolumen benötigt wird (Murphy, 2011). An dieser Stelle kann spekuliert werden, dass die geringere Zellgröße von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ einen Hinweis auf geringere Antikörper-Sekretion darstellt (siehe hierzu auch Kapitel 4.4.2), jedoch ist die Zellgröße allein kein ausreichender Parameter, um diesbezüglich eine valide Aussage treffen zu können.

Des Weiteren wurde überprüft, ob sich bei der Expression der typischen KM PZ Marker CD38, CD27 und CD138 Unterschiede zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ feststellen lassen. Tatsächlich ließ sich bei CD19<sup>+</sup> KM PZ signifikant mehr CD27 und CD38 auf der Oberfläche anfärben, als bei CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, während die Expression von CD138 bei beiden PZ Populationen ähnlich war. CD138 gehört zur Familie der Syndekane und Proteoglykane, bindet Proteine der extrazellulären Matrix und ist daher u. a. ein Mediator von Zellmigration und –adhäsion (Ala-Kapee et al., 1990; Mali et al., 1990). Die Expression von CD138 erfolgt im Zuge der PZ-Differenzierung. Dabei gibt es jedoch gewebsspezifische Unterschiede, so dass eine starke Expression von CD138 als typisch für PZ des KM, jedoch nicht für PZ anderer Gewebe angesehen werden kann (Medina et al., 2002; Mei et al., 2007) (Abb. 7). Da die in Abb. 13 untersuchten CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> PZ jeweils aus dem KM isoliert wurden, kann die vergleichbar hohe Expressionsrate von CD138 auf diesen beiden Zellpopulationen als Bestätigung des Gewebsursprungs angesehen werden. CD38, auch bekannt als zyklische ADP Ribose-Hydrolase, ist ein Glykoprotein, welches auf

verschiedenen Leukozyten-Zelllinien, darunter T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen, exprimiert wird und an diversen zellulären Prozessen wie Zelladhäsion, Signaltransduktion einschließlich  $\text{Ca}^{2+}$  Influx beteiligt ist (Deaglio und Malavasi, 2006). Während der Differenzierung von B-Zellen zu PB steigt die Expression von CD38 an, so dass PB und PZ eine hohe Expressionsrate von CD38 aufweisen. CD38 gilt somit als Aktivierungsmarker (Funaro et al., 1997; Quarona et al., 2013), ebenso wie CD27, welches ebenfalls während der PB-Differenzierung hochreguliert und von PB/PZ stark exprimiert wird. CD27 bindet an CD70 und übernimmt durch Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs wichtige Funktionen in der B-Zell-Aktivierung und Ig-Synthese (Akiba et al., 1998; zusammengefasst in Borst et al., 2005; Yamamoto et al., 1998). Die stärkere Expression von CD38 und CD27 auf CD19<sup>+</sup> KM PZ könnte dafür sprechen, dass diese PZ-Population verglichen mit CD19<sup>(-)</sup> KM PZ in einem „aktivierteren“ Zustand ist und dies eventuell darauf beruht, dass CD19<sup>+</sup> KM PZ das Stadium der PB noch nicht so lange hinter sich gelassen haben wie CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob CD19<sup>+</sup> KM PZ tatsächlich reife PZ repräsentieren, oder noch eine PB-Population darstellen, die sich gerade erst im KM niedergelassen und die endgültige Differenzierung zu PZ noch nicht durchlaufen hat. PB lassen sich durch die starke Expression des MHC-II-Moleküls HLADR von HLADR<sup>gering</sup> exprimierenden reifen PZ abgrenzen. Eine Untersuchung der HLADR-Expression auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ ergab, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nur eine schwache Ausprägung von HLADR auf ihrer Oberfläche zeigen, während sich bei CD19<sup>+</sup> KM PZ ein heterogenes Bild von HLADR<sup>stark/gering</sup> exprimierenden Zellen ergab. Im Gegensatz hierzu waren die MHC-I-Moleküle HLA-ABC auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant stärker nachweisbar als auf CD19<sup>+</sup> KM PZ. Bedenkt man, dass HLADR im Zuge der PB-Differenzierung herunterreguliert wird und durch die parallel erfolgende Repression von Markern der B-Zelllinie eine verstärkte Expression linienunspezifischer Faktoren wie HLA-ABC erfolgen kann, sprechen diese Ergebnisse für eine höhere Reife der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.

Da sich PB auch durch ihre migratorischen und proliferativen Eigenschaften von reifen PZ unterscheiden, wurden diese Aspekte in Bezug auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ geprüft. Eine Migration gegen verschiedene Zytokine, darunter auch CXCL12, konnte *in vitro* für Gesamt-KM PZ nicht bestätigt werden (Mei et al., 2009a). Zudem ließ eine CFSE-Färbung von *ex vivo* isolierten CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ keine Proliferation dieser Populationen erkennen (Frölich, Mei, Wirries, unveröffentlichte Daten), allerdings sind Zellkulturversuche zum Nachweis von Proliferation bei diesen Zelltypen nicht optimal, da PB und PZ nach Isolation *in vitro* rasch sterben.

Eine andere Möglichkeit, den Proliferationsstatus von Zellen zu bestimmen, liegt in der intrazellulären Detektion von Ki67, welches in Zellen mit einem aktiven Zellzyklus nachgewiesen werden kann, in ruhenden Zellen jedoch fehlt (Scholzen und Gerdes, 2000). Da der Nachweis von Ki67 durchflusszytometrisch innerhalb kürzester Zeit nach Zellisolation erfolgen kann, sind die Nachteile einer Zellkultur hier aufgehoben. Zum Vergleich der Ki67-Expression in PB und PZ dienten neben CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zum einen Blutproben, die gesunden Spendern entnommen wurden und im homöostatischen Zustand eine Mischung aus PB und PZ enthalten, zum anderen

wurden Blutproben analysiert, die Probanden eine Woche nach Vakzinierung gegen Tetanus/Diphtherie entnommen wurden und somit eine hohe Zahl an neu gebildeten PB aufweisen sollten. Tatsächlich konnte bestätigt werden, dass sowohl die CD19<sup>(-)</sup> als auch die CD19<sup>+</sup> KM PZ Population kaum bis gar keine Ki67<sup>+</sup> Zellen enthalten, während PB/PZ im Blut einen hohen Prozentsatz an Ki67<sup>+</sup> Zellen aufweisen. Daraus kann geschlossen werden, dass beide KM PZ Fraktionen aus reifen PZ bestehen, die keine proliferativen Eigenschaften besitzen und somit von PB unterschieden werden können.

Interessant war jedoch die Feststellung, dass CD19<sup>+</sup> KM PZ trotz der insgesamt geringen Rate signifikant mehr Ki67<sup>+</sup> Zellen enthalten als CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. Dies spricht für eine höhere Dynamik bzw. Umsatzrate innerhalb der CD19<sup>+</sup> PZ Fraktion (siehe hierzu auch Kapitel 4.4.4). Eine Verunreinigung mit CD19<sup>+</sup> Blut-PB kann nahezu ausgeschlossen werden, da der Anteil an PB im Blut für gewöhnlich sehr niedrig und daher im Vergleich zur Menge an KM PZ vernachlässigbar ist (vgl. hierzu 3.1.1 und Abb. 8C). Zudem ließ eine Ko-Färbung von Ki67 und HLADR unter Ki67<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> KM PZ keinen Hinweis darauf erkennen, dass Ki67<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> KM PZ tatsächlich HLADR<sup>stark</sup> exprimierende PB darstellen (Wirries, unveröffentlichte Daten). Es scheint folglich denkbar, dass unter Berücksichtigung der höheren Expressionsrate von CD27 und CD38 und des damit möglicherweise aktivierteren Zustands von CD19<sup>+</sup> KM PZ diese Zellen eine gewisse Dynamik aufweisen, die es ihnen ermöglicht, unter bestimmten Umständen wieder in den Zellzyklus einzutreten (Tooze, 2013).

Insgesamt repräsentieren CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ den Phänotyp terminal differenzierter PZ, wobei CD19<sup>(-)</sup> KM PZ aufgrund von im Vergleich zu CD19<sup>+</sup> KM PZ schwächerer Expression von CD27 und CD38 sowie der Herunterregulation von HLADR einen höheren Reifegrad vermuten lassen als CD19<sup>+</sup> KM PZ.

#### 4.3.2.2 Expression von Ko-Rezeptoren des BZR-Signalwegs auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ

CD19 liegt auf B-Zellen in einem Komplex mit CD21 und CD81 vor und beteiligt sich durch Verstärkung des BZR-Signalwegs an der Regulation von Immunantworten. Die Abwesenheit von CD19 auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ führte zu der Frage, ob diese Zellpopulation neben CD19 auch andere Ko-Rezeptoren des BZR-Signalwegs vermissen lässt. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant weniger CD21, CD81, CD32B und CD45 exprimieren als CD19<sup>+</sup> KM PZ (Abb. 16, Abb. 17). Die Ergebnisse für CD21 und CD81 sind dabei konform mit den Beobachtungen von van Zelm et al. (2006), die bei Patienten mit homozygoter Mutation des CD19-Gens eine geringe bis abwesende Expression von CD19 mit reduziertem Level an CD21 und leicht abgeschwächter, aber immer noch starker Expression von CD81 feststellten.

CD45 gehört zur Gruppe der Phosphotyrosin-Phosphatasen. Durch Regulation der Phosphorylierung von Lyn und der damit verbundenen Aktivierung dieser Kinase beteiligt sich CD45 an der Signaltransduktion des BZR (Brown et al., 1994). Während B-Zellen CD45 in hohem Maße exprimieren, ist die Differenzierung von PB zu PZ mit

einem graduellen Verlust von CD45 assoziiert (Pellat-Deceunynck und Bataille, 2004). Eine schwächere Expression von CD45 auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ spricht folglich abermals für einen höheren Reifegrad dieser Zellen.

Neben seiner inhibitorischen Funktion bei B-Zellen scheint CD32B auch eine Rolle in der Regulation der PZ-Homöostase zu spielen. So legen sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Untersuchungen von Xiang et al. (2007) im Maus-Modell nahe, dass Ligation von CD32B durch einen negativen *feedback-loop* die Ig-Sekretion inhibiert und eine Apoptose von PZ begünstigt und somit ein Überschießen der Antikörperproduktion und damit der humoralen Immunantwort verhindert. Eine schwächere Expression von CD32B auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ würde folglich bedeuten, dass diese PZ von regulatorischen Maßnahmen weniger betroffen sind und somit stabiler in ihrer Homöostase und Aufgabe als Antikörper-produzierende Zellpopulation sind als CD19<sup>+</sup> KM PZ.

Interessanterweise konnten Xiang et al. die verstärkte Apoptose von PZ nach CD32B-Ligation mit einer Regulation durch Mitglieder der Bcl2-Familie in Zusammenhang bringen, da in Bim-defizienten Mäusen die Apoptoserate mit und ohne CD32B-Ligation vergleichbar war (Xiang et al., 2007). Bim ist ein Gegenspieler von Bcl2 und wirkt pro-apoptotisch, während Bcl2 die Apoptose inhibiert. Die signifikant stärkere Expression von Bcl2 in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ verglichen mit CD19<sup>+</sup> KM PZ (siehe dazu auch 4.3.2.4) könnte folglich ebenfalls zu einer geringeren Regulation der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ durch CD32B beitragen.

Insgesamt lässt die schwächere Expression der Ko-Rezeptoren CD21, CD81, CD45 und CD32B auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ darauf schließen, dass diese PZ Population weniger Regulationsbedarf aufweist, möglicherweise aufgrund höherer Reife oder größerer Stabilität.

#### 4.3.2.3 Expression von Molekülen mit Beteiligung an Adhäsion und Migration

Aufgrund der Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse, welche nahe legen, dass CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ sich in ihren Eigenschaften bezüglich Zellmigration und Adhäsion unterscheiden könnten, wurden einige Moleküle durchflusszytometrisch untersucht, denen eine Funktion in den oben genannten Prozessen zugeschrieben wird. Zwar werden reife PZ im Gegensatz zu PB generell als sesshafte, nicht-migratorische Zellen angesehen, allerdings stammen die zugrunde liegenden Daten aus *in vitro* Versuchen oder Maus-Modellen, so dass solche Aussagen für das humane System mit Vorsicht interpretiert werden sollten. Tatsächlich konnten Nakayama et al. (2003) bei *ex vivo* isolierten humanen PZ noch eine gerichtete Migration gegen CXCL12, CXCL16 und CCL28 feststellen. Es ist also durchaus denkbar, dass die Niederlassung von PB/PZ im menschlichen KM nicht endgültig erfolgt, sondern möglicherweise eine Übersiedelung von einer Nische in eine andere innerhalb des KM stattfinden kann. Leider wird aufgrund technischer Beschränkungen ein Nachweis solcher Fluktuationen im humanen KM schwierig sein.

Da CD62L in den Affymetrix-Daten als signifikant differenziell exprimiertes Gen auftauchte, wurde überprüft, ob es als Protein auf der Oberfläche von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ detektiert werden kann. CD62L spielt eine entscheidende Rolle in der Immigration zirkulierender Zellen in sekundäre lymphatische Gewebe und wird von verschiedenen Leukozyten im Blut exprimiert (Berg et al., 1993; Butcher und Picker, 1996; Gallatin et al., 1983; Hamann et al., 1991). In Übereinstimmung mit dem aktuellen Stand der Literatur war CD62L auf beiden KM PZ Populationen nicht nachweisbar (Luque et al., 1998; Medina et al., 2002), ebenso wie S1PR1, welches vor allem am Austritt von Zellen aus lymphatischem Gewebe ins Blut beteiligt ist (Matloubian et al., 2004). So führt eine Defizienz von S1PR1 in B-Zellen zu einer Anreicherung Antikörper-sezernierender Zellen in Lymphknoten und Milz, während PZ-Zahlen im KM stark reduziert sind (Kabashima et al., 2006). Die Abwesenheit von CD62L und S1PR1 auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ verdeutlicht, dass beide Populationen aus Zellen bestehen, die bereits im KM lokalisiert sind und für die das Migrationsvermögen aus sekundären lymphatischen Geweben hinaus oder in sie hinein keine Rolle mehr spielt, anders als bei PB/PZ im Blut, welche größtenteils CD62L exprimieren (Medina et al., 2002). Für eine Zellmigration innerhalb des KM ist bisher keine Beteiligung von CD62L oder S1PR1 dokumentiert.

Auch CD99 und CD9 gehören zu jenen Molekülen, die eine Rolle in der Migration und Adhäsion von Zellen übernehmen und bei der Genexpressionsanalyse von CD19<sup>+</sup> versus CD19<sup>(-)</sup> KM PZ signifikant differenziell exprimiert wurden. Durchflusszytometrisch konnte bestätigt werden, dass CD99 auf CD19<sup>+</sup> KM PZ stärker nachweisbar ist, während CD9 auf der Oberfläche von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ in höherem Maße detektiert werden kann (Abb. 18). CD9 gehört zur Gruppe der Tetraspanine und kann die Funktion von Integrinen durch Aktivierung und Stabilisierung der Ligandenbindung unterstützen (Yanez-Mo et al., 2009). Insbesondere für  $\beta$ 1-Integrin ist ein positiver Einfluss von CD9 dokumentiert (Yoon et al., 2014). Da  $\beta$ 1-Integrin auf KM PZ in großer Menge exprimiert wird (Abb. 19) und das Überleben von PZ durch Verankerung in KM-Nischen fördert (DiLillo et al., 2008), könnte CD9 ebenfalls zum Erhalt der PZ im KM beitragen. Eine stärkere Expression von CD9 auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ würde folglich die Überlebensfähigkeit dieser PZ-Population begünstigen. Die bekannteste Rolle des Glykoproteins CD99 liegt in der Vermittlung von Zellmigration (Bixel et al., 2004; Schenkel et al., 2002; Seol et al., 2012), allerdings wurde eine hohe Expressionsrate von CD99 auch mit einer verstärkten Produktion B-Zell-typischer Marker wie Pax5, CD19, CD79 $\alpha$  und Bcl-6 und einer Re-Differenzierung von Hodgkin-Lymphom-Zellen zu B-Zellen assoziiert (Zhou et al., 2013). Es lässt sich also spekulieren, dass CD19<sup>+</sup> KM PZ durch die größere Menge an exprimiertem CD99 eine bessere Fähigkeit zur Migration besitzen, oder dass das geringere Vorkommen von CD99 auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ abermals für eine höhere Reifestufe von CD19<sup>(-)</sup> PZ spricht.

Ein weiteres Protein, das sich an der Migration von Zellen beteiligen kann, ist CD146 (MCAM). Dieses ursprünglich in Melanom-Zellen identifizierte Adhäsionsmolekül spielt eine Rolle in der Extravasation von Lymphozyten und der Adhäsion im Gewebe durch Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten (Guezguez et al., 2007; Wang und Yan,



2013). Da CD146 auf der Oberfläche von CD19<sup>+</sup> KM PZ signifikant stärker nachgewiesen werden konnte als auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, spricht dieses Ergebnis abermals für eine in CD19<sup>+</sup> KM PZ eventuell vorhandene Migrationskapazität. Es ist auch denkbar, dass CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ in unterschiedlichen Nischen lokalisiert sind und sich durch Ausbildung verschiedener Adhäsionsmolekülprofile an die örtlichen mikroanatomischen Gegebenheiten anpassen.

Ein weiteres Indiz hierfür ist die differentielle Expression von CD44 und CD56. CD44 ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure, einen Bestandteil der extrazellulären Matrix, und gilt als ein Mediator von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten (Goodison et al., 1999). Obwohl CD44 in den Affymetrix-Daten keine signifikant differenzielle Ausprägung zeigte, konnte die stärkere Expression von CD44 auf CD19<sup>+</sup> KM PZ mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Auch die unterschiedliche Expression von CD56 (NCAM) auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ konnte durchflusszytometrisch bestätigt werden. CD56 wurde ursprünglich als Marker für NK-Zellen beschrieben, kann aber auch auf einer Vielzahl anderer Zelllinien, nicht jedoch auf B-Zellen, nachgewiesen werden (Husmann et al., 1989; Vargas et al., 1994; <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd56.html>). Eine Hochregulation dieses Glykoproteins auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ kann somit ein Hinweis auf einen höheren Reifegrad dieser Zellen sein, da die Repression von Transkriptionsfaktoren der B-Zelllinie im Verlauf der PZ-Differenzierung häufig mit einer verstärkten Expression linienuntypischer Marker korreliert. Zudem wird CD56 auf PZ des multiplen Myeloms (MM) exprimiert (Van Camp et al., 1990), wobei CD56<sup>+</sup> MM einen besseren prognostischen Verlauf aufweisen als CD56<sup>(-)</sup> MM (Sahara und Takeshita, 2004). Dies mag daran liegen, dass eine verstärkte Expression von CD56 auf Tumorzellen mit reduzierter PZ-Zahl im Blut und verminderter Infiltration des KM einhergeht (Rawstron et al., 1999), was vermutlich auf der Retention CD56<sup>+</sup> PZ im KM beruht. CD56 kann also möglicherweise die Verankerung von PZ in ihrer Nische fördern. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen gestützt, die eine homotypische Interaktion von CD56<sup>+</sup> PZ mit CD56-exprimierenden Osteoblasten und/oder mesenchymalen Stammzellen nahe legen (Barille et al., 1995; Battula et al., 2009; Ely und Knowles, 2002).

Interessanterweise konnte auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine signifikant stärkere Expression von CCR10 und  $\beta$ 7-Integrin detektiert werden. Diese fördern die Migration v. a. von IgA<sup>+</sup> PZ in mukosale Gewebe und gelten daher als mukosale Marker (Kunkel und Butcher, 2003). Auch im KM konnte die Expression von CCR10 und  $\beta$ 7-Integrin schon früher festgestellt werden, allerdings auch hier hauptsächlich im Zusammenhang mit IgA<sup>+</sup> PZ (Mei et al., 2009a). Ein Vergleich der Expression von CCR10 und  $\beta$ 7-Integrin auf Gesamt-IgA<sup>+</sup> und Gesamt-IgG<sup>+</sup> KM PZ brachte keine signifikanten Unterschiede zutage (Wirries, unveröffentlichte Daten). Somit liegt die Vermutung nahe, dass sich die Funktion von CCR10 und  $\beta$ 7-Integrin nicht nur auf die Migration IgA<sup>+</sup> PZ beschränkt, sondern im KM möglicherweise noch eine andere Wirkungsweise innehat.

Unter den Kandidaten, die in der Genexpressionsanalyse als signifikant differenziell exprimierte Gene auftauchten, befinden sich auch die Adhäsionsmoleküle TJP1,

PKP2, DSG2 und DST. Diese sind Bestandteile von *Tight Junctions*, Desmosomen und Hemidesmosomen und beteiligen sich folglich ebenfalls an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten oder Verknüpfungen von Zellen mit der Basallamina (Furuse et al., 1994; Hofmann et al., 2000; Hopkinson und Jones, 2000; Itoh et al., 1997; Steinberg et al., 1987). Leider war eine Verifizierung der Expressionsunterschiede auf Proteinebene nicht möglich, da für diese Moleküle bisher keine kommerziell erhältlichen Antikörper für durchflusszytometrische Analysen verfügbar sind und die Durchführung eines Westernblots sich für CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ aufgrund zu geringer Zell-/Proteinmengen als ungeeignet herausstellte.

Angesichts der unterschiedlichen Expression von Adhäsionsmolekülen auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ liegt die Vermutung nahe, dass sich die beiden Zellpopulationen auch hinsichtlich ihrer Lokalisation im KM unterscheiden. Um diese Hypothese zu untersuchen und mögliche Interaktionspartner der KM PZ zu identifizieren, wurde im Verlauf der Arbeit versucht, CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ mittels Immunfluoreszenz in Kryoschnitten von humanen KM-Proben zu detektieren. Dieser Ansatz war in mehrerlei Hinsicht technisch herausfordernd: Um eine den natürlichen Gegebenheiten möglichst nahe kommende Gewebestruktur zu erhalten, sollte die Dekalzifizierung der KM-Stücke, wie sie für Paraffinschnitte standardmäßig durchgeführt wird, vermieden werden. Eine von Kawamoto et. al. entwickelte Methode, bei der dünne Klebestreifen verwendet werden, an denen Gewebeschnitte haften bleiben, ermöglichte die Gewinnung von Kryoschnitten aus humanem KM (Kawamoto, 2003; Kawamoto und Kawamoto, 2014). Auf diese Weise war es möglich, KM PZ nach intrazellulärer Färbung von Kappa- und Lambda-Untereinheiten mit fluoreszenzgekoppelten Detektionsantikörpern am Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Eine spezifische Färbung von CD19 mit Anti-CD19-Antikörpern gelang jedoch nicht, obwohl zahlreiche verschiedene Klone, Fixationsmittel und Färbetechniken ausprobiert wurden. Auch die Demaskierung von CD19 mittels *Antigen Retrieval* brachte kein positives Ergebnis. Als Konsequenz folgte in Kooperation mit Sonya Demski (Arbeitsgruppe Prof. Carmen Scheibenbogen, Institut für Medizinische Immunologie der Charité Berlin) und Dr. Anja A. Kühl (Abteilung für Immunpathologie, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie der Charité Berlin) der Versuch, CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ durch Färbung von Paraffinschnitten aus humanem KM immunhistochemisch zu detektieren. Obwohl KM PZ als CD138<sup>+</sup> Zellen identifiziert und B-Zellen mittels CD19-Färbung sichtbar gemacht werden konnten, blieb eine Ko-Färbung von CD138 und CD19 auf PZ erfolglos. Da eine Unterscheidung zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ somit nicht möglich war und in Ermangelung alternativer Methoden musste der histologische Ansatz zur Aufklärung der Lokalisation dieser beiden Populationen verworfen werden. Nichtsdestotrotz ließen sich bei der Färbung CD138<sup>+</sup> Gesamt-KM PZ auf Paraffinschnitten verschiedene Muster erkennen: Während einige PZ in Clustern eng beieinander lagen und direkte Kontakte zueinander bildeten, waren andere PZ vereinzelt über die Gewebeausschnitte verstreut (Kühl, unveröffentlichte Daten). Hier wäre es sehr interessant, herauszufinden, ob die Gruppen-bildenden PZ womöglich zur CD19<sup>(-)</sup>

Population gehören (und daher vermutlich auch verstärkt Adhäsionsmoleküle exprimieren, die *Tight Junctions* und Desmosomen bilden), während CD19<sup>+</sup> KM PZ vermehrt als einzelne Zellen anzutreffen sind. Die Entwicklung geeigneter histologischer Methoden zur Untersuchung dieses Sachverhalts würde einen bedeutenden Beitrag zur Charakterisierung von PZ-Nischen im humanen KM leisten.

Zusammengefasst gibt die differenzielle Expression der Adhäsions- und Migrationsmoleküle CD9, CD99, CCR10,  $\beta$ 7-Integrin, CD146, CD44 und CD56 auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Hinweise auf eine unterschiedliche Lokalisation dieser PZ Subpopulationen innerhalb des KM, welche sich z. B. auch in der Besetzung verschiedener Überlebensnischen ausprägen könnte. Die histologische Untersuchung der Lokalisation von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> PZ im Gewebe und die Bestimmung von (potenziellen) Interaktionspartnern im humanen KM stellt somit ein interessantes Gebiet für zukünftige Projekte dar.

#### 4.3.2.4 Expression von Überlebensfaktoren

Eine weitere in der Genexpressionsanalyse identifizierte Gruppe differenziell exprimierter Gene beinhaltet Faktoren, denen die Beeinflussung der Überlebensfähigkeit von KM PZ zugeschrieben wird. Zur Verifizierung der Affymetrix-Daten wurde die Expressionsstärke des antiapoptotischen Moleküls Bcl2 sowie des auf PZ antiapoptotisch wirkenden Rezeptors CD28 durchflusszytometrisch auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ gemessen. Dabei bestätigte sich, dass beide Kandidaten von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ in höherem Maße exprimiert werden. Bcl2 ist ein wichtiges antiapoptotisches Protein, das im Zytoplasma lokalisiert ist und zusammen mit einer Reihe verwandter Moleküle den Zelltod reguliert. Während Bcl2 in Gedächtnis-B-Zellen und PB schwach bis moderat exprimiert wird, kann dieses Protein in KM PZ in hohem Maße detektiert werden (Jourdan et al., 2009). Die Langlebigkeit von KM PZ wird deshalb u. a. auf die verstärkte Expression von Bcl2 zurückgeführt (Yoshida et al., 2010). Folglich könnte die höhere Expression von Bcl2 in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ ein Indiz für eine bessere Überlebensfähigkeit dieser Population sein.

Hierfür spricht auch die signifikant stärkere Detektion von CD28 auf der Oberfläche von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. Wie in 1.3.4 geschildert, fördert CD28 das Überleben von PZ im KM durch Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs. Ursprünglich als Marker auf T-Zellen beschrieben, wird CD28 von PZ im Zuge ihrer Differenzierung hochreguliert, vermutlich im Zusammenhang mit dem graduellen Verlust B-Zell-typischer Faktoren wie Pax5 (Delogu et al., 2006; Kozbor et al., 1987). Somit kann CD28 auch als Reifungsmarker für PZ gesehen werden. Die ausgeprägtere Expression von CD28 auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ lässt also darauf schließen, dass diese PZ vermehrt antiapoptotische Signale erhalten und eine höhere Reife besitzen als CD19<sup>+</sup> KM PZ.

Ein weiterer Faktor in der Regulation des Zelltods ist die Expression des pro-apoptotischen Fas-Rezeptors CD95. Obwohl die Expression dieses Moleküls in den Affymetrix-Daten keine Signifikanz aufwies, war CD95 auf Proteinebene auf CD19<sup>+</sup> KM PZ signifikant stärker nachweisbar als auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. Ligation von CD95 führt zur Bildung eines Apoptose-induzierenden Komplexes (DISC, *death-inducing*

*signaling complex*) und zur Aktivierung von Caspasen und mündet schließlich im programmierten Zelltod (Trauth et al., 1989; Yonehara, 1999). Eine vermehrte Expression von CD95 auf der Zelloberfläche könnte CD19<sup>+</sup> KM PZ Zellen also angreifbarer für extrinsische, pro-apoptotische Signale machen. Zudem wird eine erhöhte Expression von CD95 mit einem aktivierten Phänotyp in Verbindung gebracht (Jacobi et al., 2008). Dies würde abermals dafür sprechen, dass sich CD19<sup>+</sup> KM PZ in einem aktivierteren Zellstadium geringeren Reifegrades befinden.

Da in der Literatur auch ein überlebensfördernder Effekt von CD93 bei KM PZ dokumentiert ist (siehe 1.3.4), wurde überprüft, ob auf CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine unterschiedliche Expression dieses Proteins festgestellt werden kann. Sowohl die Genexpressionsanalyse als auch die durchflusszytometrische Detektion von CD93 ergaben, dass dieser Rezeptor auf beiden KM PZ Populationen in vergleichbarer Intensität vorhanden ist. Der positive Einfluss von CD93 auf das Überleben der PZ ist also bei beiden Zellfraktionen in gleicher Weise gegeben.

Zusammengefasst lässt die stärkere Expression von CD28 und Bcl2 sowie die geringere Expression von CD95 bei CD19<sup>(-)</sup> KM PZ darauf schließen, dass diese Population eine im Vergleich zu CD19<sup>+</sup> KM PZ bessere Überlebensfähigkeit aufweist und möglicherweise eine besonders langlebige KM PZ Fraktion repräsentiert.

#### **4.3.3 Einfluss von microRNAs auf Unterschiede zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ**

Der Weg vom Transkript eines Gens bis zur Bildung des zugehörigen Proteins kann auf posttranskriptioneller Ebene durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Kleine regulatorische RNAs spielen dabei eine zentrale Rolle (zusammengefasst in Wittmann und Jäck, 2010). miRNAs können durch Bindung an eine Ziel-mRNA deren Translation verhindern oder ihre Degradation bewirken (Bartel, 2009). Das Protein kann folglich nicht gebildet und nachgewiesen werden, obwohl eine Transkription des kodierenden Gens in mRNA stattgefunden hat. Wird die Ziel-mRNA nach Bindung einer komplementären miRNA abgebaut, sinkt entsprechend auch die Menge dieser mRNA. Findet nur eine Hemmung der Translation statt, kann die mRNA je nach Bindungsstelle einer detektierenden Sonde weiterhin nachgewiesen werden. Bei der Auswertung von Genexpressionsdaten ist es folglich wichtig, solche posttranskriptionellen Regulationsmechanismen zu berücksichtigen. So konnten bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ einige signifikante Unterschiede zwischen den beiden Populationen festgestellt werden, die in den Affymetrix-Daten keine differenzielle Ausprägung zeigten. Umgekehrt ist es möglich, dass in der Genexpressionsanalyse signifikant differenziell exprimierte Kandidaten ermittelt werden, die Unterschiede auf Proteinebene jedoch nicht mehr nachweisbar sind. Solche Diskrepanzen könnten mit der unterschiedlichen Regulation durch miRNAs erklärt werden.

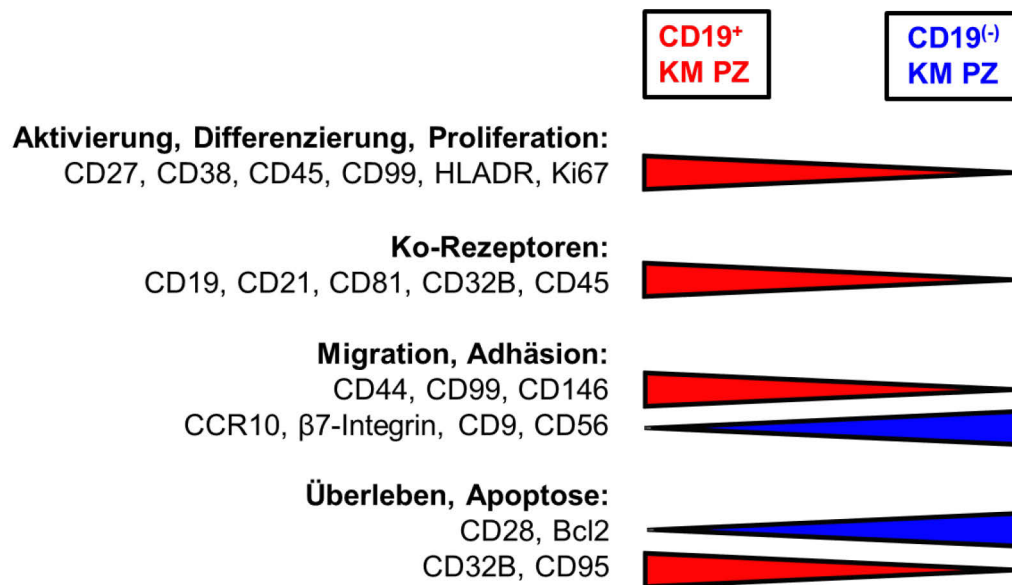
Um zu überprüfen, ob in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ miRNAs unterschiedlich stark exprimiert sind, wurde in Kooperation mit der Firma Vertis Biotechnologie AG (Freising, Deutschland) eine miRNA-Expressionsanalyse mittels *deep sequencing*

durchgeführt und die daraus erhobenen Daten in Zusammenarbeit mit Dr. Jürgen Wittmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hans-Martin Jäck (Abteilung für Molekulare Immunologie, Medizinische Klinik 3, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen) ausgewertet, um einen Überblick über sämtliche in KM PZ exprimierte miRNAs zu erhalten. In Übereinstimmung mit den Daten von Porstner et al. (2015) machte miR-148a (neben miR-29) den größten Anteil vorhandener miRNAs in KM PZ aus. Ein signifikanter Unterschied zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ konnte jedoch für keine miRNA festgestellt werden. Somit scheint es unwahrscheinlich, dass miRNAs für die differenzielle Ausprägung bestimmter Proteine in CD19<sup>+</sup> versus CD19<sup>(-)</sup> KM PZ verantwortlich sind.

#### **4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus Genexpressionsanalyse und Durchflusszytometrie**

Fasst man die Ergebnisse aus Genexpressionsanalyse und Durchflusszytometrie zusammen, kann festgehalten werden, dass sich die Resultate für einige Moleküle, die signifikant unterschiedliche mRNA-Werte zeigten und auf Proteinebene überprüft werden konnten, auch in der Durchflusszytometrie bestätigten. Eine Ausnahme bildete CD62L, welches in Übereinstimmung mit dem aktuellen Stand der Literatur weder auf CD19<sup>+</sup> noch auf CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich konnten mittels Durchflusszytometrie noch einige weitere signifikant differenziell exprimierte Proteine identifiziert werden. Insgesamt zeichnen die erhobenen Daten ein Bild, bei dem CD19<sup>+</sup> KM PZ durch die stärkere Expression von CD27, CD38, CD45, CD99 und HLADR sowie eines größeren Anteils Ki67<sup>+</sup> Zellen eine aktiviertere, näher am Blastenstadium liegende Zellpopulation darstellen, während sich CD19<sup>(-)</sup> KM PZ durch die geringe Expression von CD45 und die verstärkte Expression von Bcl2, CD28 und CD56 als Zellen höherer Reife abzeichnen. Zudem lässt die erhöhte Nachweisbarkeit der Migrationsmoleküle CD99 und CD146 sowie die Abwesenheit des eventuell als „Anker“ dienenden CD56 auf CD19<sup>+</sup> KM PZ spekulieren, dass diese Zellfraktion *in situ* noch migrieren kann, möglicherweise zwischen unterschiedlichen Überlebensnischen. Dies stünde zwar im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Daten aus Maus-Experimenten (Hauser et al., 2002), jedoch lassen Analysen mit murinen Zellen und *in vitro* Versuche nur bedingt Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation im humanen KM zu. Des Weiteren lässt die geringe Expression von CD95 und die erhöhte Expression von CD28 und Bcl2 in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine bessere Überlebensfähigkeit dieser Zellen vermuten, was nahe legt, dass gerade CD19<sup>(-)</sup> KM PZ einen entscheidenden Beitrag zur Bildung einer langlebigen PZ-Population im KM leisten und damit für die Aufrechterhaltung des humoralen Immungedächtnisses von zentraler Bedeutung sind.

Abb. 36 bietet eine Übersicht über die in den Kapiteln 4.3.2.1 bis 4.3.2.4 diskutierten Ergebnisse.



**Abb. 36: Schematische Darstellung der Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Phänotypisierung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.** CD19<sup>+</sup> KM PZ exprimieren verstärkt Moleküle, die einen aktivierten Zustand geringeren Reifegrades vermuten lassen und zeigen höhere Expressionsraten von Ko-Rezeptoren des BZR-Signalwegs. CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ weisen ebenfalls unterschiedliche Expressionsstärken einiger Migrations- und Adhäsionsmoleküle auf. Die überlebensfördernden Faktoren CD28 und Bcl2 werden von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ stärker exprimiert, während auf CD19<sup>+</sup> KM PZ mit CD32B und CD95 vermehrt Faktoren nachweisbar sind, die eine pro-apoptotische Funktion ausüben können.

Zusammengefasst können auf Basis der bisherigen Ergebnisse folgende Hypothesen aufgestellt werden:

- CD19<sup>(-)</sup> KM PZ weisen einen höheren Reifegrad auf als CD19<sup>+</sup> KM PZ.
- CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ sind aufgrund unterschiedlicher Profile von Adhäsionsmolekülen möglicherweise in unterschiedlichen Nischen des KM lokalisiert.
- CD19<sup>(-)</sup> KM PZ besitzen eine im Vergleich zu CD19<sup>+</sup> KM PZ erhöhte Überlebenskapazität.

Diese Hypothesen spiegeln die Resultate einer molekularbiologischen und phänotypischen Beschreibung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ wider und bedürfen einer Überprüfung durch funktionelle Studien, welche in Kapitel 4.4 diskutiert werden.

#### 4.3.5 Mögliche Szenarien für die Entstehung von CD19<sup>(-)</sup> KM

Betrachtet man die oben genannten Hypothesen, stellt sich die Frage, wie CD19<sup>(-)</sup> KM PZ entstehen. Die Entwicklung von PZ im gesunden Immunsystem wurde in der Vergangenheit häufig untersucht und in der Regel exprimierten die resultierenden PZ CD19. Eine Unterscheidung zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> in Bezug auf ihre Differenzierung fand jedoch bisher nicht statt. Daher ist unklar, ob für die Entwicklung von CD19<sup>(-)</sup> PZ die gleichen Mechanismen gelten wie für CD19<sup>+</sup> KM PZ.

Generell bieten sich für die Entstehung von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> PZ zwei unterschiedliche Szenarien an: 1. CD19<sup>(-)</sup> PZ entstehen aus CD19<sup>+</sup> PZ durch bisher unbekannte Reifungsprozesse. 2. CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> PZ entwickeln sich unabhängig

voneinander in dichotomer Weise, möglicherweise aus unterschiedlichen Vorläuferzellen. Für das zweite Szenario wäre denkbar, dass sich die beiden unterschiedlichen PZ-Populationen als Reaktion auf die Anregung des Immunsystems durch verschiedene Antigene bilden, also beispielsweise eine Population eher antivirale Antikörper bildet, während die andere Population als Antwort auf z. B. bakterielle Infektionen entsteht. Die unterschiedlichen Halbwertszeiten antiviraler und antibakterieller Antikörpertiter könnten auf diese Weise erklärt werden (Aman et al., 2007). Berücksichtigt man frühere Ergebnisse zu CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, in denen festgestellt wurde, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine geringere Mutationsfrequenz aufweisen als CD19<sup>+</sup> KM PZ (Mei et al., 2015), ist auch denkbar, dass CD19<sup>(-)</sup> PZ während primärer Immunantworten entstehen, CD19<sup>+</sup> KM PZ jedoch hauptsächlich aus sekundären Reaktionen, bei denen bereits mutierte Gedächtnis-B-Zellen erneut eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen und folglich zusätzliche Mutationen ansammeln. Ein weiterer möglicher Grund für die geringere Mutationsfrequenz in CD19<sup>(-)</sup> PZ wäre zudem, dass CD19<sup>(-)</sup> PB/PZ früher aus Keimzentrumsreaktionen austreten als CD19<sup>+</sup> PB/PZ. Eine Entstehung von CD19<sup>+</sup> oder CD19<sup>(-)</sup> KM PZ im Rahmen von TI Immunantworten ist eher unwahrscheinlich, da beide PZ-Populationen die charakteristischen Merkmale von Keimzentrumsreaktionen aufweisen, nämlich Klassenwechsel und somatische Hypermutation (Mei et al., 2015). Eine Affinitätsreifung konnte mit den zur Verfügung stehenden Mitteln im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht überprüft werden, dies stellt jedoch ein interessantes Gebiet für zukünftige Untersuchungen dar. Die im Folgenden diskutierten funktionellen Studien zu CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ sollten neben der Verifikation der molekularbiologischen Daten auch bei der Aufklärung helfen, welche der oben genannten Differenzierungswege für CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zutrifft.

#### **4.4 Funktionelle Studien zu CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ**

##### **4.4.1 Vergleich der Überlebensfähigkeit von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ *in vitro***

Um die Hypothese zu testen, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine womöglich bessere Überlebensfähigkeit besitzen als CD19<sup>+</sup> KM PZ, wurden die beiden Zellfraktionen aus KM-Proben isoliert, in Kultur genommen und die Anzahl überlebender Zellen in regelmäßigen Zeitabständen innerhalb von zwei Wochen bestimmt. Durch Zugabe verschiedener Kombinationen der überlebensfördernden Zytokine APRIL, BAFF, CXCL12 und IL6 konnte die Apoptose der KM PZ bei der CD19<sup>+</sup> und der CD19<sup>(-)</sup> Population in ähnlichem Ausmaß vermieden werden. Dabei zeigte sich eine gewisse Redundanz bezüglich der verwendeten Zytokine, insbesondere im direkten Vergleich von APRIL und BAFF, da bei Verwendung von APRIL + BAFF + CXCL12 + IL6 bzw. BAFF + CXCL12 + IL6 oder APRIL + CXCL12 + IL6 kein Unterschied in der Überlebensrate von KM PZ festgestellt werden konnte (Abb. 23A, B). Indem BAFF und APRIL beide an den BCMA-Rezeptor auf PZ binden, scheint BAFF in Abwesenheit von APRIL dessen überlebensfördernde Funktion übernehmen zu

können, während bei gleichzeitiger Präsenz dieser Zytokine entweder aufgrund von Konkurrenz um denselben Rezeptor oder wegen Absättigung des Signalweges nach Bindung von BAFF oder APRIL kein synergistischer Effekt auftritt. Eine solche Schlussfolgerung passt in das aktuelle Bild der Literatur, wo *in vivo* Daten nahe legen, dass APRIL eine Hauptfunktion unter der Vielzahl überlebensfördernder Zytokine im KM übernimmt, BAFF jedoch in APRIL-defizienten Mäusen den Erhalt langlebiger PZ im KM sichern kann (Belnoue et al., 2008; Belnoue et al., 2012; Benson et al., 2008). Insgesamt zeigte die CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Fraktion prozentual einen besseren Erhalt vitaler Zellen als die CD19<sup>+</sup> KM PZ Fraktion – sowohl mit als auch ohne Zugabe von Zytokinen – jedoch war der Unterschied nicht signifikant (Abb. 23C).

Ein ähnliches Ergebnis konnte mittels Ko-Kultur von KM-Stromazellen mit CD19<sup>+</sup> oder CD19<sup>(-)</sup> KM PZ erzielt werden. Da für Stromazellen ein überlebensfördernder Effekt auf KM PZ dokumentiert ist (Hiepe, 2009; Minges Wols et al., 2002 und 2007), schien das System einer Ko-Kultur geeignet, die Überlebensfähigkeit von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ *in vitro* zu überprüfen. Auch hier waren zu den gemessenen Zeitpunkten im Verlauf von zwei Wochen durchschnittlich mehr vitale CD19<sup>(-)</sup> KM PZ detektierbar als vitale CD19<sup>+</sup> KM PZ, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Wirries, unveröffentlichte Daten).

Insgesamt zeigen die *in vitro* Daten somit einen tendenziellen Vorteil von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ in ihrer Überlebensfähigkeit. Allerdings sollten *in vitro* Analysen mit isolierten KM PZ stets unter Vorbehalt betrachtet werden, da mehrfach dokumentiert wurde, dass die Zellen durch die Mechanismen des Isolationsprozesses stark gestresst sind und nach Herauslösung aus ihrer Nische einer rasch einsetzenden Apoptose unterliegen (z. B. Cassese et al., 2003), was sich auch bei den oben beschriebenen Experimenten durch einen starken Abfall der Anzahl vitaler Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Isolation bemerkbar machte. Aktuelle Forschungsansätze befassen sich mit dieser Problematik, indem versucht wird, die Überlebensnische humaner KM PZ *in vitro* möglichst naturgetreu zu rekonstruieren, um so optimale Voraussetzungen für funktionelle Studien humaner KM PZ zu schaffen (S. Schmidt, unveröffentlichte Daten). Es wäre also interessant, in Zukunft die Überlebensfähigkeit von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> humanen KM PZ in einem System zu prüfen, welches die *in vivo* Situation bestmöglichst widerspiegelt.

#### **4.4.2 Sowohl CD19<sup>+</sup> als auch CD19<sup>(-)</sup> KM PZ weisen Antigenspezifitäten gegen Tetanus, Mumps und Masern auf**

Um der Frage nachzugehen, ob CD19<sup>(-)</sup> KM PZ unabhängig von CD19<sup>+</sup> KM PZ entstehen, indem sie möglicherweise als Ergebnis unterschiedlicher Immunreaktionen gebildet werden (siehe 4.3.5), wurden die Antigenspezifitäten beider KM PZ Populationen mittels ELISpot und ELISA untersucht. Die Kriterien der ausgewählten Spezifitäten beliefen sich zum einen darauf, dass sowohl virale Antigene als auch Antigene bakteriellen Ursprungs untersucht werden sollten, um herauszufinden, ob die Antigen-Spezifitäten der beiden PZ-Populationen einer



bestimmten Gruppe zugeordnet werden können, zum anderen lag der Fokus auf Antigenen, mit denen die meisten Menschen im Erwachsenenalter bereits in Kontakt gekommen sind. Als Vertreter der Antigengruppe bakteriellen Ursprungs wurde daher das Proteinantigen Tetanus Toxoid (TT) gewählt, da eine Immunisierung gegen TT nach Empfehlung der STIKO des Robert-Koch-Instituts bereits bei Säuglingen erfolgen und auch im Erwachsenenalter alle 10 Jahre aufgefrischt werden sollte. Zur Detektion antiviraler Antikörper-produzierender Zellen wurden Antigene von Masern und Mumps ausgewählt, da seit den 1970er Jahren Kleinkinder gegen diese Erkrankungen geimpft werden sollten und vor Einführung der Impfstoffe in den meisten Fällen zumindest eine dieser „Kinderkrankheiten“ im Kindesalter durchlebt worden ist (RKI, Epidemiologisches Bulletin, 25. August 2014, Nr. 34). Zusätzlich wurden KM PZ auf die Anwesenheit EBV-spezifischer PZ hin getestet, da davon ausgegangen werden kann, dass >90% der Erwachsenen sich bis zum 40. Lebensjahr mit EBV infiziert haben.

Mittels ELISpot ließen sich antigenspezifische PZ für TT, Masern und Mumps sowohl in der CD19<sup>+</sup> als auch in der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Fraktion nachweisen. Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl spezifischer Zellen gegen ein bestimmtes Antigen konnte dabei zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nicht festgestellt werden. Allerdings wies die CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Fraktion eine größere Varianz auf und enthielt zumindest tendenziell mehr spezifische Zellen gegen TT, Masern und Mumps als die CD19<sup>+</sup> KM PZ Population (Abb. 24). Die Auswertung der ELISpots bereitet insbesondere hinsichtlich der Daten zu Masern und Mumps Schwierigkeiten, da die verwendeten Antigene aus Verolysat stammen und einen hohen Hintergrund in Form kleiner, unspezifischer Punkte („Spots“) verursachen, die nicht auf eine Antikörper-Produktion durch PZ zurückzuführen sind. Dadurch besteht die Gefahr, durch Mitzählen solcher falsch-positiver Spots die Ergebnisse zu verfälschen. Um dieses Risiko zu vermeiden, wurden die Spots mit Hilfe einer Software ausgezählt, die unspezifische Spots anhand ihrer Größe und Form von spezifischen Spots unterscheidet und folglich nicht berücksichtigt. Die Form und Größe unspezifischer Spots konnte durch das Mitführen von Negativkontrollen (in denen keine PZ eingesät wurden) bestimmt werden. Als Kernaussage der ELISpot-Analysen kann festgehalten werden, dass beide KM PZ Populationen spezifische Zellen sowohl gegen virale Antigene als auch gegen bakterielle Proteinantigene enthalten.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurde die Menge antigenspezifischer Antikörper aus Überständen von Zellkulturen mit CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ mittels ELISA bestimmt. Auch hier konnten Antikörper gegen TT, Masern und Mumps in den Überständen beider PZ-Populationen detektiert und die Ergebnisse der ELISpot-Versuche somit bestätigt werden (Anti-EBV-Antikörper wurden im ELISA nicht gemessen). Dabei fiel auf, dass in den Überständen der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Population durchweg mehr antigenspezifische Antikörper enthalten waren als in den Überständen der CD19<sup>+</sup> KM PZ Population, obwohl die eingesäten Zellzahlen für beide Fraktionen gleich waren. Tatsächlich lag bei einigen Donoren v. a. der OD-Wert der CD19<sup>+</sup> Fraktion im Bereich der Negativkontrolle. Hier zeigt sich, dass der Anteil spezifischer Zellen nicht für alle Donoren gleich ist, sondern von Spender zu

Spender variiert, was zusammen mit der begrenzten Verfügbarkeit isolierter KM PZ zu einem Detektionsproblem führen kann. Wie im ELISpot verdeutlicht, liegt der Anteil spezifischer Zellen im Promille-Bereich. Entsprechend viele Zellen müssen beim ELISpot oder der dem ELISA vorausgehenden Zellkultur eingesät werden, um Antikörper einer bestimmten Spezifität nachweisen zu können. Aus Gründen der Verfügbarkeit wurden in den gezeigten Experimenten nur  $1-2 \times 10^4$  PZ pro Well eingesät. Der Einsatz von  $10^5$  bis  $10^6$  Zellen pro Well wäre sicherlich optimaler, setzt jedoch auch eine große Menge an Ausgangsmaterial voraus, die hier nicht gegeben war. Zudem werden PZ während der Isolation aus dem KM stark belastet, wodurch viele Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Isolation sterben. Diese Beeinträchtigung betrifft allerdings sowohl  $CD19^+$  als auch  $CD19^{(-)}$  KM PZ (siehe 4.4.1).

Es besteht die Möglichkeit, dass innerhalb der  $CD19^{(-)}$  KM PZ Fraktion anteilig mehr spezifische Zellen gegen TT, Masern und Mumps enthalten sind. Dies kann damit begründet werden, dass die OD-Werte der untersuchten Spezifitäten für  $CD19^{(-)}$  KM PZ stets höher lagen als diejenigen der  $CD19^+$  KM PZ Population (Abb. 25A-C), während die ermittelten Werte für Gesamt-IgG bei beiden Populationen vergleichbar waren (Abb. 25D). Die höheren OD-Werte der  $CD19^{(-)}$  PZ Population bei Ermittlung der antigenspezifischen Antikörpermengen können also nicht mit einer höheren Sekretionsrate an IgG durch  $CD19^{(-)}$  KM PZ begründet werden. Berücksichtigt man zusätzlich, dass innerhalb der  $CD19^{(-)}$  KM PZ Fraktion anteilig mehr  $IgG^+$  PZ enthalten sind als in der  $CD19^+$  KM PZ Fraktion (Mei et al., 2015), weist die insgesamt vergleichbare Menge an produziertem Gesamt-IgG darauf hin, dass im Durchschnitt eine einzelne  $IgG^+$   $CD19^{(-)}$  KM PZ weniger IgG sezerniert als eine einzelne  $IgG^+$   $CD19^+$  KM PZ (also weniger „potent“ ist). Ein Indiz hierfür könnte auch die geringere Zellgröße von  $CD19^{(-)}$  KM PZ sein (siehe 4.3.2.1). Folglich könnte die im ELISA nachgewiesene größere Menge spezifischer Antikörper gegen TT, Masern und Mumps in der  $CD19^{(-)}$  KM PZ Fraktion nur durch einen höheren Anteil spezifischer Zellen gegen diese Antigene innerhalb der  $CD19^{(-)}$  PZ Population erklärt werden. Möglicherweise sind  $CD19^{(-)}$  KM PZ also spezialisierter auf Antigene, mit denen der menschliche Organismus schon früh (im Säuglings- oder Kindesalter) in Kontakt kommt, während  $CD19^+$  KM PZ eine größere Bandbreite an Spezifitäten aufweisen. Eine umfassendere Analyse sämtlicher Antigen-Spezifitäten von  $CD19^{(-)}$  und  $CD19^+$  KM PZ erscheint hier erforderlich, die im Rahmen weiterführender Projekte durchgeführt wird.

Als Hauptaussage aus ELISpot- und ELISA-Experimenten bleibt in jedem Fall die Erkenntnis, dass antigenspezifische Zellen gegen TT, Masern und Mumps (und EBV) sowohl in der  $CD19^+$  als auch in der  $CD19^{(-)}$  KM PZ Fraktion detektiert werden konnten. Eine Differenzierung der beiden Populationen aus unterschiedlichen Vorläuferzellen im Rahmen einer Spezialisierung auf antivirale versus antibakterielle Immunabwehr kann somit weitgehend ausgeschlossen werden und unterstützt die Annahme der Differenzierung von  $CD19^{(-)}$  KM PZ aus  $CD19^{(+)}$  Vorläufer-PZ.

#### 4.4.3 Unterschiedliche Vorkommen von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> PZ im KM von Säuglingen und Erwachsenen

Um der Hypothese nachzugehen, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ aufgrund ihrer im Vergleich zu CD19<sup>+</sup> KM PZ niedrigeren Mutationsfrequenz aus primären Immunantworten stammen könnten, wurden PZ aus dem roten KM von Schädelknochenfragmenten analysiert, die Säuglingen im Alter zwischen fünf und sieben Monaten im Rahmen einer Behandlung der Kraniosynostose entnommen worden waren. Gemäß den Empfehlungen der STIKO des Robert-Koch-Instituts hatten die Donoren bereits in diesem jungen Alter einige Grundimmunisierungen durchlaufen, z. B. gegen Tetanus, Diphtherie und Pertussis sowie gegen Polio, Hepatitis B und Pneumokokken.

Tatsächlich enthielt die PZ-Population im KM der Säuglinge neben einigen (vermutlich kurzlebigen) IgM<sup>+</sup> PZ und wenigen IgA<sup>+</sup> PZ überwiegend klassengewechselte IgG<sup>+</sup> PZ, die darauf schließen lassen, dass im Verlauf der Immunantworten nach Vakzinierung bereits Keimzentrumsreaktionen durchlaufen worden waren. Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen KM PZ von Säuglingen und Erwachsenen zu erreichen, wurde bei der durchflusszytometrischen Messung der Säuglings-PZ darauf geachtet, PB durch Eingrenzung auf CD38<sup>++</sup> CD20<sup>(-)</sup> HLADR<sup>gering</sup> exprimierende Zellen auszuschließen. Interessanterweise exprimierten alle detektierbaren reifen PZ im Säuglings-KM den Oberflächenmarker CD19 und wiesen durch die Expression von CD44 und Abwesenheit von CD56 einen Phänotyp auf, der dem von CD19<sup>+</sup> KM PZ bei Erwachsenen entspricht. Zwar kann argumentiert werden, dass die Untersuchung von KM aus Schädelknochen nur bedingt vergleichbar ist mit den Daten aus Hüft-KM von Erwachsenen, allerdings konnten bei Erwachsenen keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen KM-Quellen (Femurkopf, Beckenkamm, Sternum) festgestellt werden (Mei et al., 2015). Daher ist unwahrscheinlich, dass Schädel-KM hier eine Ausnahme darstellt. Allerdings sollte bedacht werden, dass bei Säuglingen der PZ-Pool im KM möglicherweise noch nicht ausgereift ist, da frühere Untersuchungen nahe legen, dass im frühen Kindesalter PZ in Ermangelung funktioneller Überlebensnischen nicht im KM festgehalten werden können (Pihlgren et al., 2001 und 2006). Da die Daten von Pihlgren et. al. aber in Maus-Experimenten erhoben wurden, kann nur spekuliert werden, inwiefern Überlebensnischen im humanen KM ähnlichen Reifungsprozessen bei Säuglingen unterliegen. Aufschlussreich wäre dahingehend sicherlich, KM PZ von Kindern im Alter zwischen 1 und 6 Jahren untersuchen zu können, da gerade in dieser Zeitspanne, u. a. bedingt durch den Kontakt zu anderen Kindern in Kinderkrippe und Kindergarten, die größte Entwicklung und Adaption des Immunsystems an Herausforderungen durch verschiedene Antigene stattfindet. KM-Proben solch junger Donoren waren aber während der Dauer der vorliegenden Doktorarbeit nicht verfügbar.

Geht man davon aus, dass die detektierten, klassengewechselten PZ im Säuglings-KM bereits das Potenzial zur Langlebigkeit besitzen, lässt die Abwesenheit von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ schlussfolgern, dass bei Immunantworten (auch bei primären) im Rahmen von Keimzentrumsreaktionen zunächst CD19<sup>+</sup> PB gebildet werden, die

anschließend in das KM einwandern, in Nischen zu CD19<sup>+</sup> PZ heranreifen und möglicherweise *in situ* nach einiger Zeit zu CD19<sup>(-)</sup> PZ weiter differenzieren.

#### **4.4.4 Nach primärer und sekundärer Immunantwort im Blut detektierbare PB und PZ exprimieren CD19**

Obwohl die Ergebnisse der Säuglings-KM-Studien nicht auf eine direkte Entstehung von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ während früher Immunantworten verweisen, sollte in einem weiteren Versuchsansatz bei Erwachsenen mit einem ausgereiften Immunsystem überprüft werden, ob die geringere Mutationsfrequenz von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nicht doch damit zu begründen sein könnte, dass sie bei primären Immunantworten aus weniger stark mutierten Vorläuferzellen gebildet werden, unabhängig von der Entwicklung CD19<sup>+</sup> PZ.

Um eine primäre Immunantwort zu induzieren, wurde im Rahmen einer Studie durch Claudia Giesecke (Arbeitsgruppe Prof. Thomas Dörner, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité Berlin) in Zusammenarbeit mit Dr. Tim Meyer (Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin) eine Immunisierung gesunder, erwachsener Probanden mit KLH-Antigen (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) durchgeführt und den Donoren in den darauffolgenden Wochen regelmäßig peripheres Blut entnommen, um die Bildung antigenspezifischer PB nachzuvollziehen. Der hochmolekulare Proteinkomplex KLH wird aus der Hämolymphe der Großen Kalifornischen Schlüssellochschnecke aus der Familie der Schlitzschnecken gewonnen. Da Menschen für gewöhnlich nicht in Kontakt mit diesen Meeresschnecken kommen, kann davon ausgegangen werden, dass eine Vakzinierung mit KLH eine erste Begegnung des erwachsenen Immunsystems mit diesem Antigen darstellt und somit eine primäre Immunantwort hervorruft. Etwa 10 Tage nach der Immunisierung konnten erste KLH-spezifische PB im peripheren Blut nachgewiesen werden, ihre Anzahl stieg bis zum 14.-17. Tag nach Vakzinierung an und nahm anschließend wieder ab. Etwa drei Wochen nach Immunisierung konnten keine KLH-spezifischen PB mehr im peripheren Blut detektiert werden. So gut wie alle KLH-spezifischen PB exprimierten dabei CD19, unabhängig vom gemessenen Zeitpunkt (Giesecke, Meyer, Manuskript in Vorbereitung). Diese Ergebnisse geben einen zusätzlichen Hinweis darauf, dass bei primären Immunantworten augenscheinlich keine CD19<sup>(-)</sup> PB aus B-Zellen gebildet werden und somit auch CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nicht durch Ausdifferenzierung von CD19<sup>(-)</sup> PB nach solchen Immunreaktionen entstehen.

Möglicherweise kann die geringere Mutationsfrequenz von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ jedoch daraus resultieren, dass CD19<sup>(-)</sup> PZ von CD19<sup>(-)</sup> PB stammen, die während sekundärer Immunreaktionen früher aus dem Keimzentrum austreten als CD19<sup>+</sup> PB und somit eine geringere Anzahl somatischer Hypermutationen anhäufen können. Um diese Hypothese zu testen, wurde eine Vakzinierungsstudie durchgeführt, bei der erwachsene Probanden eine Auffrischimpfung gegen Tetanus/Diphtherie erhielten und anschließend über den Zeitraum von zwei Wochen in regelmäßigen Zeitabständen

Blutproben zur Analyse von PB/PZ bereitstellten. Da bei allen Impfungen zuvor eine Grundimmunisierung gegen TT im Kindesalter sowie regelmäßige Auffrischimpfungen erfolgt waren (wobei die letzte mindestens sieben Jahre zurück lag), wird durch dieses System eine sekundäre Immunantwort induziert. Die Auswahl von TT als Antigen basierte auf den unter 4.4.2 diskutierten Ergebnissen der ELISpots und ELISA-Messungen, bei denen festgestellt werden konnte, dass sowohl die CD19<sup>+</sup> als auch die CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Population TT-spezifische Antikörper-sezernierende Zellen enthält. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Studien zu sekundären Immunisierungen (Frölich et al., 2010; Stevens et al., 1979) konnte ein Anstieg TT-spezifischer PB im Blut bis zum 6./7. Tag nach Vakzinierung beobachtet werden, gefolgt von einem raschen Abfall der PB-Zahlen. Dabei exprimierten praktisch alle TT-spezifische PB zu allen gemessenen Zeitpunkten CD19 auf ihrer Oberfläche. Auch durch die Begutachtung aller IgG<sup>+</sup> HLADR<sup>stark</sup> PB konnten keine CD19<sup>(-)</sup> PB detektiert werden. Damit kann praktisch ausgeschlossen werden, dass sich TT-spezifische CD19<sup>(-)</sup> KM PZ aus CD19<sup>(-)</sup> PB heraus entwickeln. Vielmehr scheinen CD19<sup>+</sup> PB/PZ die Vorläuferzellen von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zu sein, indem sie als CD19<sup>+</sup> PB in das KM einwandern, dort zu Überlebensnischen hingezogen werden und durch bisher ungeklärte Mechanismen *in situ* zu CD19<sup>(-)</sup> PZ differenzieren.

Interessanterweise wiesen auch reife PZ, die als HLADR<sup>gering</sup> exprimierende Zellen entsprechend des Kompartitionsprinzips um begrenzt verfügbare Nischen nach Vakzinierung durch Einwanderung neuer PB vermutlich aus dem KM herausgelöst werden und anschließend im Blut detektierbar sind (Odendahl et al., 2005; Radbruch et al., 2006), allesamt CD19 auf ihrer Oberfläche auf. Da eine Re-Differenzierung von CD19<sup>(-)</sup> PZ in CD19<sup>+</sup> PZ *in vitro* nicht beobachtet werden konnte (Abb. 23D) und auch *in vivo* unwahrscheinlich scheint, lässt dieses Ergebnis vermuten, dass lediglich die CD19<sup>+</sup> KM PZ Population von einem Austausch reifer PZ im KM durch neu generierte PB betroffen ist, während CD19<sup>(-)</sup> KM PZ nicht durch PB verdrängt wurden.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine stabile PZ Population darstellen, während CD19<sup>+</sup> KM PZ eine eher dynamische PZ Fraktion bilden. In Weiterführung dieser Theorie kann argumentiert werden, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ im Kindesalter aus CD19<sup>+</sup> KM PZ entstehen und daher noch relativ geringe Mutationsfrequenzen aufweisen sowie vor allem spezifische Zellen gegen Antigene enthalten, mit denen der kindliche Organismus früh in Kontakt kommt (wie TT, Masern, Mumps). Die im erwachsenen KM detektierbaren CD19<sup>+</sup> KM PZ könnten dementsprechend aus Immunantworten stammen, die erst in jüngerer Zeit abgelaufen sind und während derer CD19<sup>+</sup> PB mit hohen Mutationsfrequenzen aus Gedächtnis-B-Zellen generiert werden, welche bereits zum Teil mehrfache Keimzentrumsreaktionen durchlaufen haben. Durch die augenscheinliche Dynamik innerhalb des CD19<sup>+</sup> KM PZ Pools wäre eine regelmäßige Anpassung des humoralen Gedächtnisses an neue immunologische Herausforderungen gewährleistet, während eine stabile CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Population einen Basistiter an schützenden Antikörpern sicherstellen würde.

#### 4.4.5 Stimulation von BZR und CD19 aktiviert BZR-Signalweg in CD19<sup>+</sup> KM PZ

Da die Gesamtheit der bisher diskutierten Daten darauf hindeutet, dass CD19<sup>(-)</sup> KM PZ *in situ* aus CD19<sup>+</sup> KM PZ entstehen, stellte sich die Frage, welche Mechanismen eine solche Weiterdifferenzierung von CD19<sup>+</sup> KM PZ auslösen. Eine Bindung bestimmter löslicher Faktoren könnte bei dieser Entwicklung ebenso eine Rolle spielen, wie Einflüsse durch umgebende Zellen. *In vitro* konnte eine Differenzierung von CD19<sup>+</sup> zu CD19<sup>(-)</sup> KM PZ weder bei Zugabe von CXCL12, APRIL, BAFF und/oder IL6 beobachtet werden, noch bei einer Ko-Kultur mit Stromazellen. Das Augenmerk richtete sich in Folge auf die Funktion von CD19 selber. Da diese in B-Zellen die Verstärkung des BZR-Signalwegs beinhaltet, kann vermutet werden, dass auch in CD19<sup>+</sup> KM PZ der BZR-Signalweg aktiviert werden und (eventuell in Kombination mit CD19) zu einer weiteren Differenzierung dieser bisher als enddifferenziert geltenden PZ führen könnte. Sämtliche am zentralen BZR-Signalweg beteiligten Proteine werden in KM PZ exprimiert, ebenso wie der membrangebundene BZR selbst (Liesegang et al., 1978; Pinto et al., 2013) (Abb. 28), womit die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Signalerkennung und Signalweiterleitung gegeben sind. Pinto et. al. haben kürzlich gezeigt, dass der BZR der Isotypen IgA und IgM auf KM PZ durchaus funktionell ist und Ligations durch Anti-Ig-Antikörper zur Phosphorylierung intrazellulärer Signalmoleküle führt (Pinto et al., 2013). Allerdings fanden die Untersuchungen nur mit CD138<sup>+</sup> Gesamt-KM PZ ohne Berücksichtigung von CD19 statt. Daher wurden die Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit auf beide PZ-Populationen ausgeweitet, um eine Vergleichbarkeit zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zu erreichen. Da im humanen KM nur sehr wenige IgM<sup>+</sup> PZ enthalten sind und für zuverlässige Resultate eine gewisse minimale Zellzahl nötig ist, die bei Messungen von IgM<sup>+</sup> PZ nicht erzielt werden konnte, beschränkten sich die Experimente auf IgG<sup>+</sup> und IgA<sup>+</sup> KM PZ. Eine Hemmung des BZR-Signalwegs bei Stimulation mit Anti-Ig-Antikörpern durch unbeabsichtigte Bindung des Stimulations-Antikörpers an den inhibitorischen FcγRIIB kann ausgeschlossen werden, da zur Stimulation F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente verwendet wurden, die keinen Fc-Teil besitzen und folglich nicht an Fc-Rezeptoren binden können.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass Stimulation sowohl von IgG als auch von IgA bei CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine Phosphorylierung der intrazellulären Signalmoleküle Syk und PLCγ2 bewirkt. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Pinto et. al., welche für IgG<sup>+</sup> PZ keine Stimulierbarkeit feststellten. Ein möglicher Grund für diese Diskrepanz kann in der Verwendung unterschiedlicher Stimulationsantikörper liegen, da eigene Beobachtungen darauf schließen lassen, dass die Effizienz der Stimulation neben dem Alter der Zellen und den Isolationsmethoden stark davon abhängt, welcher Antikörper zur Stimulation benutzt wurde (Firma, Klon, Charge etc.). So verwendeten Pinto et al. Anti-kappa- und Anti-lambda-Antikörper von Southern Biotech (Birmingham, AL, USA), während in dieser Doktorarbeit mit Antikörpern von Jackson ImmunoResearch (Newmarket, Großbritannien) stimuliert wurde (Tabelle 8). Zudem betrug die Stimulationsdauer bei Pinto et al. 15 Minuten, während in den hier dargestellten Experimenten der BZR nur

fünf Minuten lang stimuliert wurde, da in einer eigens hierfür erstellten Kinetik die stärkste Phosphorylierung von Syk und PLC $\gamma$ 2 in KM PZ nach 5 bis 8 Minuten detektiert werden konnte und anschließend der Phosphorylierungsgrad wieder abnahm.

Insgesamt war die stimulationsbedingte Phosphorylierung von Syk und PLC $\gamma$ 2 in IgA<sup>+</sup> und IgG<sup>+</sup> PZ ähnlich stark ausgeprägt. Auch zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ konnten bei alleiniger BZR-Stimulation zunächst nur geringfügige Unterschiede festgestellt werden, wobei tendenziell CD19<sup>+</sup> KM PZ eine bessere Stimulierbarkeit aufwiesen als CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. Diese ersten Ergebnisse bestätigen, dass KM PZ funktionelle BZR auf ihrer Oberfläche exprimieren und eine BZR-Stimulation auch in diesen Zellen die Phosphorylierung intrazellulärer Signaltransduktionsmoleküle bewirkt, wenngleich der beobachtete Effekt nicht so stark ausgeprägt ist wie in B-Zellen.

Als überprüft wurde, ob die Stimulation von CD19 mit einem agonistisch wirkenden Antikörper einen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad intrazellulärer Signalmoleküle hat, konnte bei CD19<sup>+</sup> KM PZ ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung von Syk und Btk verzeichnet werden, und zwar sowohl bei kombinierter Stimulation von CD19 und BZR als auch bei Stimulation von CD19 alleine. Der Phosphorylierungsgrad von Syk und Btk erreichte dabei sogar das Niveau von in gleicher Weise stimulierten CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus dem KM. Wie zu erwarten, beschränkte sich der positive Effekt einer CD19-Stimulation bei PZ auf die CD19<sup>+</sup> Population. Es kann also geschlossen werden, dass CD19 auf PZ kein „Relikt“ darstellt, sondern bei entsprechender Stimulation eine funktionelle Rolle übernehmen und zur verstärkten Phosphorylierung intrazellulärer Signalmoleküle beitragen kann. Ob eine solche Stimulation *in vivo* ablaufen kann, bleibt Spekulation, da ein Ligand für CD19 nicht bekannt und die Rolle von CD21 als Partner von CD19 bei PZ nicht geklärt ist.

Überraschend war auch der Befund, dass zwar Syk und Btk durch CD19-Stimulation phosphoryliert wurden, der Effekt bei PLC $\gamma$ 2 aber ausblieb. Da die signalverstärkende Wirkung von CD19 laut aktuellem Stand der Literatur über Btk und Syk laufen kann, letztendlich aber in die verstärkte Aktivität von PLC $\gamma$ 2 münden sollte (Fujimoto et al., 1999 und 2000; Pauls et al., 2012; Scharenberg et al., 2007), ist fraglich, warum der amplifizierende Effekt einer CD19-Stimulation in PZ nicht bei PLC $\gamma$ 2 ankommt. Fehlt in PZ möglicherweise ein bisher unbekanntes Element der Signalkaskade? Oder kann in PZ ein PLC $\gamma$ 2-unabhängiger Signalweg aktiviert werden? Da ein spezifischer Nachweis der Phosphorylierung der stromabwärts liegenden Kinase Akt aus technischen Gründen nicht möglich war, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Eine genauere Untersuchung des CD19-Signalwegs in PZ würde sicherlich einen großen Beitrag dazu leisten, die Rolle von CD19 auf PZ besser zu verstehen.

Die oben diskutierten Versuche bestätigen, dass PZ auf ihrer Oberfläche membrangebundene BZR exprimieren, deren Ligation durch Anti-Ig-Antikörper zur Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade führt und dieser Effekt in CD19<sup>+</sup> KM PZ

stärker ausgeprägt ist als in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. Nichtsdestotrotz bleibt die Frage bestehen, welche funktionelle Konsequenz eine solche Stimulation für die PZ beinhaltet, zumal bisher davon ausgegangen wurde, dass die Gesamtzahl von KM PZ sowie deren Antikörperproduktion durch die Anwesenheit von Antigenen nicht beeinflusst wird (Manz, 1998). Um dieser Frage nachzugehen, wurden PZ in Zellkultur mit Anti-BZR- und/oder Anti-CD19-Antikörpern stimuliert und die Anzahl vitaler Zellen sowie die Expressionsstärke bestimmter Oberflächenmoleküle über mehrere Tage hinweg bestimmt. Dabei konnte nach Stimulation innerhalb der CD19<sup>+</sup> und der CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Fraktion weder eine veränderte Expression von HLADR als Marker aktivierter Zellen noch ein Anstieg Ki67<sup>+</sup> Zellen als Zeichen für in den Zellzyklus zurückgekehrte und wieder proliferierende Zellen detektiert werden. Auch eine reduzierte Expressionsstärke von CD19 auf CD19<sup>+</sup> PZ konnte nicht festgestellt werden, ebenso wenig wie eine Veränderung der Expressionsstärken von CD27, CD38 und CD44 (Wirries, unveröffentlichte Daten). Zumindest *in vitro* konnte folglich kein Hinweis darauf gefunden werden, dass die Stimulation von PZ über den BZR und/oder CD19 diese wieder in einen aktivierteren Zustand versetzen oder die Differenzierung von CD19<sup>+</sup> in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ einleiten kann. Lediglich ein starker negativer Einfluss auf das Überleben der PZ *in vitro* konnte verzeichnet werden und stimmt mit den Befunden von Pinto et. al. überein (Pinto et al., 2013). Möglicherweise ist dieser Effekt vergleichbar mit naiven B-Zellen, die ebenfalls in Apoptose gehen, wenn sie nach Ligation des BZR kein zusätzliches kostimulatorisches Signal (z. B. über CD40-CD40L Interaktion mit T-Zellen) erhalten. Andererseits kann hier argumentiert werden, dass PZ zur Gruppe sogenannter Effektorzellen gehören und keine Kostimulation benötigen sollten, ebenso wie Gedächtnis-B-Zellen, die keiner zusätzlichen Signale bedürfen, sondern direkt durch Antigenkontakt aktiviert werden und differenzieren können.

Zusammengefasst führte die Stimulation des BZR durch Anti-Ig-Antikörper in beiden untersuchten KM PZ Populationen zu einer Phosphorylierung der intrazellulären Signalmoleküle Syk und PLC $\gamma$ 2, wobei der Effekt in CD19<sup>+</sup> KM PZ deutlich stärker ausgeprägt war als in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ. In CD19<sup>+</sup> KM PZ bewirkte zudem eine Stimulation von CD19 die Phosphorylierung von Syk und Btk, was durch gleichzeitige Stimulation von CD19 und BZR noch verstärkt werden konnte. Dies spricht dafür, dass CD19 nicht nur in B-Zellen Einfluss auf intrazelluläre Signalwege nimmt, sondern auch auf PZ noch eine funktionelle Rolle ausüben kann. Eine Beteiligung von CD19 oder des BZR-Signalwegs an der möglichen Differenzierung von CD19<sup>+</sup> KM PZ zu CD19<sup>(-)</sup> KM PZ konnte *in vitro* hingegen nicht beobachtet werden und erscheint eher unwahrscheinlich.

## 4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Fasst man die Ergebnisse der Analysen zu CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zusammen, so ergeben sich folgende Haupteigenschaften: Während CD19<sup>+</sup> PZ auch in sekundären lymphatischen Geweben detektiert werden können, finden sich CD19<sup>(-)</sup> PZ hauptsächlich im KM. Beide untersuchten PZ-Populationen bestehen aus reifen,



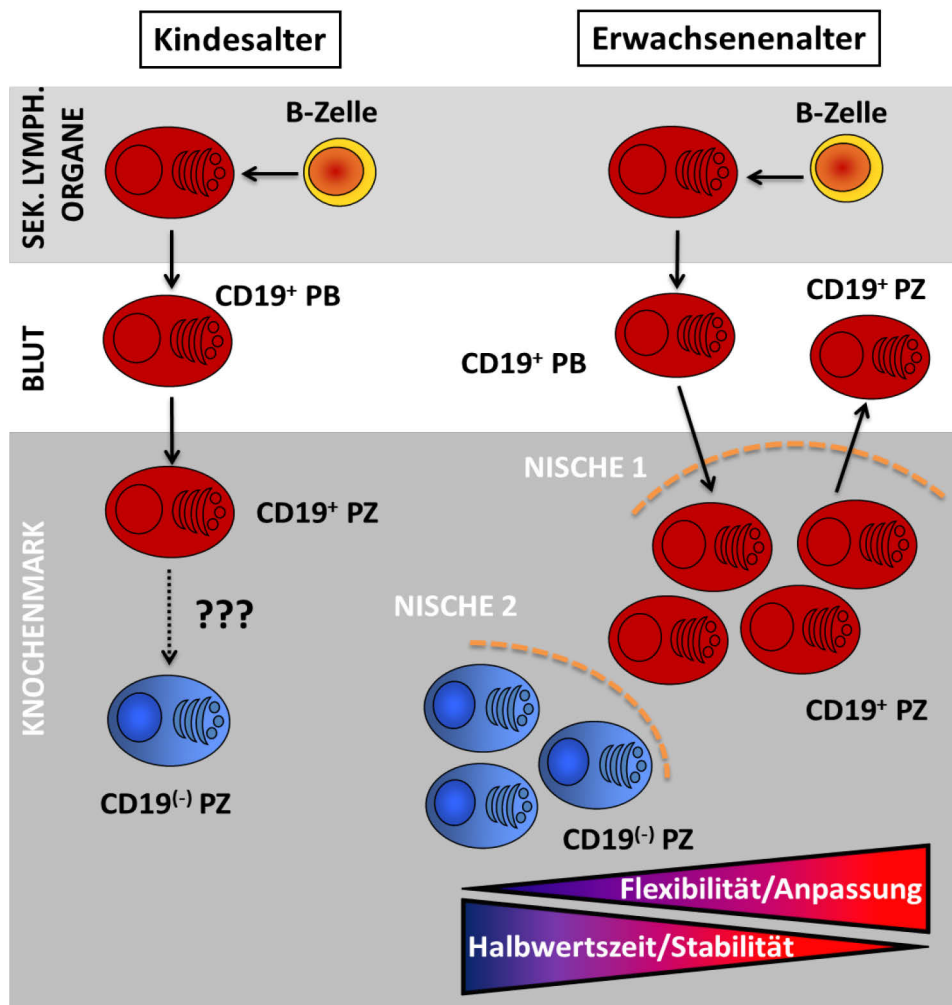
nichtproliferierenden, Antikörper-sezernierenden PZ. Dabei weisen CD19<sup>(-)</sup> KM PZ verglichen mit CD19<sup>+</sup> KM PZ einen reiferen Phänotyp auf und zeichnen sich durch eine bessere *in vitro* Überlebensfähigkeit aus. Zudem zeigen CD19<sup>+</sup> gegenüber CD19<sup>(-)</sup> KM PZ unterschiedliche Profile von Adhäsionsmolekülen, die darauf schließen lassen, dass die beiden KM PZ Populationen in verschiedenen Nischen des KM lokalisiert sein könnten.

Da sowohl CD19<sup>+</sup> als auch CD19<sup>(-)</sup> KM PZ antigenspezifische Zellen gegen TT, Masern, Mumps und EBV aufweisen, das KM von Säuglingen nur CD19<sup>+</sup> PZ enthält und sowohl nach primärer als auch nach sekundärer Vakzinierung nur CD19<sup>+</sup> HLADR<sup>stark</sup> PB und CD19<sup>+</sup> HLADR<sup>gering</sup> PZ, jedoch keine CD19<sup>(-)</sup> PB/PZ im Blut detektierbar sind, scheinen sich CD19<sup>(-)</sup> KM PZ durch bisher unbekannte Mechanismen *in situ* aus CD19<sup>+</sup> KM PZ zu entwickeln. Dieser Vorgang beginnt aller Wahrscheinlichkeit nach im frühen Kindesalter (Abb. 37), weshalb CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine geringere Mutationsfrequenz aufweisen als CD19<sup>+</sup> KM PZ, da jene auch später im Erwachsenenalter bei sekundären Immunantworten aus Gedächtnis-B-Zellen gebildet werden und deshalb mehr Keimzentrumsreaktionen mit somatischen Hypermutationen durchlaufen haben als CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.

Aufgrund ihrer Entstehung im Kindesalter könnte die CD19<sup>(-)</sup> KM PZ Population spezialisiert auf Antigene sein, denen der kindliche Organismus während seiner ersten Jahre begegnet, d.h. der CD19<sup>(-)</sup> PZ-Pool enthält mehr Zellen einer bestimmten Spezifität als der CD19<sup>+</sup> PZ-Pool, dafür beinhaltet die CD19<sup>+</sup> KM PZ Population wahrscheinlich eine größere Bandbreite an Antigen-Spezifitäten.

Aus der Gesamtheit der Daten ergibt sich ein Modell, in dem CD19<sup>(-)</sup> KM PZ eine stabile, langlebige, Antikörper-sezernierende Zellpopulation darstellen, die einen Grundtiter an protektiven Antikörpern bereitstellt und die Basis für das humorale Gedächtnis bildet, während CD19<sup>+</sup> KM PZ eine dynamische Population bilden, die die humorale Immunantwort an aktuelle Herausforderungen anpasst (Abb. 37).

Um ein vollständigeres Bild der CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ zu erhalten, wäre eine histologische Analyse der Lokalisation dieser PZ im humanen KM von Vorteil und bietet ein Feld für zukünftige Forschungsprojekte, ebenso wie die Entschlüsselung der Faktoren und Mechanismen, die eine Differenzierung von CD19<sup>+</sup> in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ bewirken.



**Abb. 37: Schematische Darstellung des Konzeptes zur Entwicklung von  $CD19^{(-)}$  KM PZ und zur Rolle von  $CD19^{+}$  und  $CD19^{(-)}$  KM PZ für das humorale Gedächtnis.** Im Kindesalter entstehen im Rahmen von Immunantworten zunächst  $CD19^{+}$  PB, die anschließend in das KM einwandern, zu reifen PZ differenzieren und sich anschließend durch bisher ungeklärte Mechanismen zu  $CD19^{(-)}$  PZ weiter entwickeln. Im Erwachsenenalter ist der  $CD19^{(-)}$  PZ-Pool bereits ausgebildet und bleibt im Gegensatz zur  $CD19^{+}$  PZ-Population von der Verdrängung durch neu generierte  $CD19^{+}$  PB unberührt. Die differenzielle Expression von Adhäsionsmolekülen auf  $CD19^{+}$  und  $CD19^{(-)}$  KM PZ spricht für eine unterschiedliche Lokalisation innerhalb des KM, möglicherweise in verschiedenen Nischen. Die  $CD19^{(-)}$  KM PZ Fraktion leistet durch hohe Halbwertszeit und Stabilität einen konstanten Beitrag zur Aufrechterhaltung des humoralen Gedächtnisses, während die  $CD19^{+}$  KM PZ Population eine flexible Komponente darstellt, die eine Anpassung der humoralen Immunität und des humoralen Gedächtnisses an aktuelle Herausforderungen gewährleistet.

## Literaturverzeichnis

### Monographien:

- Hiepe, Juliane (2009). Etablierung eines humanen Kokultur-Systems zwischen Plasmazellen und mesenchymalen Knochenmarkstromazellen. Dissertation, Charité-Universitätsmedizin Berlin.
- Murphy, Kenneth (2011). Janeway's Immunobiology. New York, Garland Science.
- Mei, Henrik (2009b). Analysen zur differentiellen Plasmazellhomöostase beim Menschen – Kontrolle des humoralen Immungedächtnisses. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin.
- Seifert, Marc (2009). Molekulare Analyse von humanen Gedächtnis-B-Zell-Populationen. Dissertation, Universität Duisburg-Essen.

### Artikel in Zeitschriften:

- Abbas, A.R., Baldwin, D., Ma, Y., Ouyang, W., Gurney, A., Martin, F., Fong, S., van Lookeren Campagne, M., Godowski, P., Williams, P.M., *et al.* (2005). Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data. *Genes and immunity* 6, 319-331.
- Ahuja, A., Anderson, S.M., Khalil, A., and Shlomchik, M.J. (2008). Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4802-4807.
- Aijaz, S., Balda, M.S., and Matter, K. (2006). Tight junctions: molecular architecture and function. *International review of cytology* 248, 261-298.
- Akiba, H., Nakano, H., Nishinaka, S., Shindo, M., Kobata, T., Atsuta, M., Morimoto, C., Ware, C.F., Malinin, N.L., Wallach, D., *et al.* (1998). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *The Journal of biological chemistry* 273, 13353-13358.
- Ala-Kapee, M., Nevanlinna, H., Mali, M., Jalkanen, M., and Schroder, J. (1990). Localization of gene for human syndecan, an integral membrane proteoglycan and a matrix receptor, to chromosome 2. *Somatic cell and molecular genetics* 16, 501-505.
- Amanna, I.J., Carlson, N.E., and Slifka, M.K. (2007). Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *The New England journal of medicine* 357, 1903-1915.
- Anderson, G., Moore, N.C., Owen, J.J., and Jenkinson, E.J. (1996). Cellular interactions in thymocyte development. *Annual review of immunology* 14, 73-99.
- Angelin-Duclos, C., Cattoretti, G., Lin, K.I., and Calame, K. (2000). Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *Journal of immunology* 165, 5462-5471.
- Arita, S., Baba, E., Shibata, Y., Niino, H., Shimoda, S., Isobe, T., Kusaba, H., Nakano, S., and Harada, M. (2008). B cell activation regulates exosomal HLA production. *European journal of immunology* 38, 1423-1434.
- Asano, N., Fujimoto, M., Yazawa, N., Shirasawa, S., Hasegawa, M., Okochi, H., Tamaki, K., Tedder, T.F., and Sato, S. (2004). B Lymphocyte signaling established by the CD19/CD22 loop regulates autoimmunity in the tight-skin mouse. *The American journal of pathology* 165, 641-650.
- Attardi, L.D., Reczek, E.E., Cosmas, C., Demicco, E.G., McCurrach, M.E., Lowe, S.W., and Jacks, T. (2000). PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes & development* 14, 704-718.
- Avery, D.T., Kalled, S.L., Ellyard, J.I., Ambrose, C., Bixler, S.A., Thien, M., Brink, R., Mackay, F., Hodgkin, P.D., and Tangye, S.G. (2003). BAFF selectively enhances the survival of

- plasmablasts generated from human memory B cells. *The Journal of clinical investigation* **112**, 286-297.
- Bahlis, N.J., King, A.M., Kolonias, D., Carlson, L.M., Liu, H.Y., Hussein, M.A., Terebelo, H.R., Byrne, G.E., Jr., Levine, B.L., Boise, L.H., *et al.* (2007). CD28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival. *Blood* **109**, 5002-5010.
  - Banerjee, D., and Slack, F. (2002). Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **24**, 119-129.
  - Barille, S., Collette, M., Bataille, R., and Amiot, M. (1995). Myeloma cells upregulate interleukin-6 secretion in osteoblastic cells through cell-to-cell contact but downregulate osteocalcin. *Blood* **86**, 3151-3159.
  - Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233.
  - Batista, F.D., Iber, D., and Neuberger, M.S. (2001). B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* **411**, 489-494.
  - Batista, F.D., and Neuberger, M.S. (1998). Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. *Immunity* **8**, 751-759.
  - Batista, F.D., and Neuberger, M.S. (2000). B cells extract and present immobilized antigen: implications for affinity discrimination. *The EMBO journal* **19**, 513-520.
  - Battula, V.L., Trembl, S., Bareiss, P.M., Gieseke, F., Roelofs, H., de Zwart, P., Muller, I., Schewe, B., Skutella, T., Fibbe, W.E., *et al.* (2009). Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica* **94**, 173-184.
  - Beaudry, V.G., Jiang, D., Dusek, R.L., Park, E.J., Knezevich, S., Ridd, K., Vogel, H., Bastian, B.C., and Attardi, L.D. (2010). Loss of the p53/p63 regulated desmosomal protein Perp promotes tumorigenesis. *PLoS genetics* **6**, e1001168.
  - Belnoue, E., Pihlgren, M., McGaha, T.L., Tougne, C., Rochat, A.F., Bossen, C., Schneider, P., Huard, B., Lambert, P.H., and Siegrist, C.A. (2008). APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* **111**, 2755-2764.
  - Belnoue, E., Tougne, C., Rochat, A.F., Lambert, P.H., Pinschewer, D.D., and Siegrist, C.A. (2012). Homing and adhesion patterns determine the cellular composition of the bone marrow plasma cell niche. *Journal of immunology* **188**, 1283-1291.
  - Benner, R., Hijmans, W., and Haaijman, J.J. (1981). The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clinical and experimental immunology* **46**, 1-8.
  - Benner, R., van Oudenaren, A., and de Ruiter, H. (1977). Antibody formation in mouse bone marrow. IX. Peripheral lymphoid organs are involved in the initiation of bone marrow antibody formation. *Cellular immunology* **34**, 125-137.
  - Benson, M.J., Dillon, S.R., Castigli, E., Geha, R.S., Xu, S., Lam, K.P., and Noelle, R.J. (2008). Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *Journal of immunology* **180**, 3655-3659.
  - Berditchevski, F. (2001). Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *Journal of cell science* **114**, 4143-4151.
  - Berg, E.L., McEvoy, L.M., Berlin, C., Bargatze, R.F., and Butcher, E.C. (1993). L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* **366**, 695-698.
  - Bernasconi, N.L., Traggiai, E., and Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* **298**, 2199-2202.
  - Bixel, G., Kloep, S., Butz, S., Petri, B., Engelhardt, B., and Vestweber, D. (2004). Mouse CD99 participates in T-cell recruitment into inflamed skin. *Blood* **104**, 3205-3213.

- Borish, L.C., and Steinke, J.W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111, S460-475.
- Borst, J., Hendriks, J., and Xiao, Y. (2005). CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Current opinion in immunology* 17, 275-281.
- Bradbury, L.E., Goldmacher, V.S., and Tedder, T.F. (1993). The CD19 signal transduction complex of B lymphocytes. Deletion of the CD19 cytoplasmic domain alters signal transduction but not complex formation with TAPA-1 and Leu 13. *Journal of immunology* 151, 2915-2927.
- Brauweiler, A., Tamir, I., Dal Porto, J., Benschop, R.J., Helgason, C.D., Humphries, R.K., Freed, J.H., and Cambier, J.C. (2000). Differential regulation of B cell development, activation, and death by the src homology 2 domain-containing 5' inositol phosphatase (SHIP). *The Journal of experimental medicine* 191, 1545-1554.
- Brieva, J.A., Roldan, E., De la Sen, M.L., and Rodriguez, C. (1991). Human in vivo-induced spontaneous IgG-secreting cells from tonsil, blood and bone marrow exhibit different phenotype and functional level of maturation. *Immunology* 72, 580-583.
- Brown, V.K., Ogle, E.W., Burkhardt, A.L., Rowley, R.B., Bolen, J.B., and Justement, L.B. (1994). Multiple components of the B cell antigen receptor complex associate with the protein tyrosine phosphatase, CD45. *The Journal of biological chemistry* 269, 17238-17244.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology* 15, 269-290.
- Busslinger, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annual review of immunology* 22, 55-79.
- Butcher, E.C., and Picker, L.J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66.
- Califano, A., Stolovitzky, G., and Tu, Y. (2000). Analysis of gene expression microarrays for phenotype classification. *Proceedings / International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* 8, 75-85.
- Cambridge, G., Leandro, M.J., Edwards, J.C., Ehrenstein, M.R., Salden, M., Bodman-Smith, M., and Webster, A.D. (2003). Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 48, 2146-2154.
- Carter, R.H., and Fearon, D.T. (1992). CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 256, 105-107.
- Cassese, G., Arce, S., Hauser, A.E., Lehnert, K., Moewes, B., Mostarac, M., Muehlinghaus, G., Szyska, M., Radbruch, A., and Manz, R.A. (2003). Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *Journal of immunology* 171, 1684-1690.
- Cassese, G., Lindenau, S., de Boer, B., Arce, S., Hauser, A., Riemekasten, G., Berek, C., Hiepe, F., Krenn, V., Radbruch, A., *et al.* (2001). Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells. *European journal of immunology* 31, 2726-2732.
- Cattoretti, G., Chang, C.C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B.H., Falini, B., Louie, D.C., Offit, K., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1995). BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86, 45-53.
- Cattoretti, G., Shaknovich, R., Smith, P.M., Jäck, H.M., Murty, V.V., and Alobeid, B. (2006). Stages of germinal center transit are defined by B cell transcription factor coexpression and relative abundance. *Journal of immunology* 177, 6930-6939.
- Charras, G., and Paluch, E. (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 730-736.
- Chen, J., McLean, P.A., Neel, B.G., Okunade, G., Shull, G.E., and Wortis, H.H. (2004). CD22 attenuates calcium signaling by potentiating plasma membrane calcium-ATPase activity. *Nature immunology* 5, 651-657.

- Cherukuri, A., Cheng, P.C., and Pierce, S.K. (2001). The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *Journal of immunology* 167, 163-172.
- Chevrier, S., Genton, C., Kallies, A., Karnowski, A., Otten, L.A., Malissen, B., Malissen, M., Botto, M., Corcoran, L.M., Nutt, S.L., *et al.* (2009). CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3895-3900.
- Chu, V.T., and Berek, C. (2013). The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunological reviews* 251, 177-188.
- Chu, V.T., and Berek, C. (2012). Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. *European journal of immunology* 42, 130-137.
- Chu, V.T., Fröhlich, A., Steinhäuser, G., Scheel, T., Roch, T., Fillatreau, S., Lee, J.J., Lohning, M., and Berek, C. (2011). Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nature immunology* 12, 151-159.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature immunology* 8, 463-470.
- Coffman, R.L., Leberman, D.A., and Rothman, P. (1993). Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Advances in immunology* 54, 229-270.
- Coggeshall, K.M. (1998). Inhibitory signaling by B cell Fc gamma RIIB. *Current opinion in immunology* 10, 306-312.
- Cohn, M. (1971). The take-home lesson--1971. *Annals of the New York Academy of Sciences* 190, 529-584.
- Commins, S.P., Borish, L., and Steinke, J.W. (2010). Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125, S53-72.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology* 22, 633-640.
- Crocker, P.R., Paulson, J.C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nature reviews Immunology* 7, 255-266.
- Cyster, J.G. (2003). Homing of antibody secreting cells. *Immunological reviews* 194, 48-60.
- D'Ambrosio, D., Hippen, K.L., Minskoff, S.A., Mellman, I., Pani, G., Siminovitch, K.A., and Cambier, J.C. (1995). Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc gamma RIIB1. *Science* 268, 293-297.
- Dal Porto, J.M., Gauld, S.B., Merrell, K.T., Mills, D., Pugh-Bernard, A.E., and Cambier, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Molecular immunology* 41, 599-613.
- de Vinuesa, C.G., O'Leary, P., Sze, D.M., Toellner, K.M., and MacLennan, I.C. (1999). T-independent type 2 antigens induce B cell proliferation in multiple splenic sites, but exponential growth is confined to extrafollicular foci. *European journal of immunology* 29, 1314-1323.
- de Vinuesa, C.G., Cook, M.C., Ball, J., Drew, M., Sunners, Y., Cascalho, M., Wabl, M., Klaus, G.G., and MacLennan, I.C. (2000). Germinal centers without T cells. *The Journal of experimental medicine* 191, 485-494.
- Deaglio, S., and Malavasi, F. (2006). The CD38/CD157 mammalian gene family: An evolutionary paradigm for other leukocyte surface enzymes. *Purinergic signalling* 2, 431-441.
- DeFranco, A.L. (1997). The complexity of signaling pathways activated by the BCR. *Current opinion in immunology* 9, 296-308.
- Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T., and Busslinger, M. (2006). Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* 24, 269-281.
- Delves, P.J., and Roitt, I.M. (2000). The immune system. First of two parts. *The New England journal of medicine* 343, 37-49.

- Dent, A.L., Shaffer, A.L., Yu, X., Allman, D., and Staudt, L.M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276, 589-592.
- Diefenbach, A., Colonna, M., and Koyasu, S. (2014). Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity* 41, 354-365.
- DiLillo, D.J., Hamaguchi, Y., Ueda, Y., Yang, K., Uchida, J., Haas, K.M., Kelsoe, G., and Tedder, T.F. (2008). Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *Journal of immunology* 180, 361-371.
- Doody, G.M., Justement, L.B., Delibrias, C.C., Matthews, R.J., Lin, J., Thomas, M.L., and Fearon, D.T. (1995). A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* 269, 242-244.
- Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 11, 1050-1062.
- Edelman, G.M. (1973). Antibody structure and molecular immunology. *Science* 180, 830-840.
- Ekert, P.G., Silke, J., and Vaux, D.L. (1999). Caspase inhibitors. *Cell death and differentiation* 6, 1081-1086.
- Ellyard, J.I., Avery, D.T., Phan, T.G., Hare, N.J., Hodgkin, P.D., and Tangye, S.G. (2004). Antigen-selected, immunoglobulin-secreting cells persist in human spleen and bone marrow. *Blood* 103, 3805-3812.
- Ely, S.A., and Knowles, D.M. (2002). Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation. *The American journal of pathology* 160, 1293-1299.
- Engel, P., Zhou, L.J., Ord, D.C., Sato, S., Koller, B., and Tedder, T.F. (1995). Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* 3, 39-50.
- Ettinger, R., Sims, G.P., Fairhurst, A.M., Robbins, R., da Silva, Y.S., Spolski, R., Leonard, W.J., and Lipsky, P.E. (2005). IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *Journal of immunology* 175, 7867-7879.
- Fairfax, K.A., Kallies, A., Nutt, S.L., and Tarlinton, D.M. (2008). Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Seminars in immunology* 20, 49-58.
- Fearon, D.T., Manders, P.M., and Wagner, S.D. (2002). Bcl-6 uncouples B lymphocyte proliferation from differentiation. *Advances in experimental medicine and biology* 512, 21-28.
- Fink, P.J., and Bevan, M.J. (1995). Positive selection of thymocytes. *Advances in immunology* 59, 99-133.
- Fong, D.C., Brauweiler, A., Minskoff, S.A., Bruhns, P., Tamir, I., Mellman, I., Daeron, M., and Cambier, J.C. (2000). Mutational analysis reveals multiple distinct sites within Fc gamma receptor IIB that function in inhibitory signaling. *Journal of immunology* 165, 4453-4462.
- Fong, D.C., Malbec, O., Arock, M., Cambier, J.C., Fridman, W.H., and Daeron, M. (1996). Selective in vivo recruitment of the phosphatidylinositol phosphatase SHIP by phosphorylated Fc gammaRIIB during negative regulation of IgE-dependent mouse mast cell activation. *Immunology letters* 54, 83-91.
- Fooksman, D.R., Schwickert, T.A., Victora, G.D., Dustin, M.L., Nussenzweig, M.C., and Skokos, D. (2010). Development and migration of plasma cells in the mouse lymph node. *Immunity* 33, 118-127.
- Foote, J.B., Mahmoud, T.I., Vale, A.M., and Kearney, J.F. (2012). Long-term maintenance of polysaccharide-specific antibodies by IgM-secreting cells. *Journal of immunology* 188, 57-67.
- Frölich, D., Giesecke, C., Mei, H.E., Reiter, K., Daridon, C., Lipsky, P.E., and Dörner, T. (2010). Secondary immunization generates clonally related antigen-specific plasma cells and memory B cells. *Journal of immunology* 185, 3103-3110.

- Fu, C., Turck, C.W., Kurosaki, T., and Chan, A.C. (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity* 9, 93-103.
- Fujimoto, M., Fujimoto, Y., Poe, J.C., Jansen, P.J., Lowell, C.A., DeFranco, A.L., and Tedder, T.F. (2000). CD19 regulates Src family protein tyrosine kinase activation in B lymphocytes through processive amplification. *Immunity* 13, 47-57.
- Fujimoto, M., Poe, J.C., Jansen, P.J., Sato, S., and Tedder, T.F. (1999). CD19 amplifies B lymphocyte signal transduction by regulating Src-family protein tyrosine kinase activation. *Journal of immunology* 162, 7088-7094.
- Fujita, N., Jaye, D.L., Geigerman, C., Akyildiz, A., Mooney, M.R., Boss, J.M., and Wade, P.A. (2004). MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte differentiation. *Cell* 119, 75-86.
- Fukuda, T., Yoshida, T., Okada, S., Hatano, M., Miki, T., Ishibashi, K., Okabe, S., Koseki, H., Hirose, S., Taniguchi, M., *et al.* (1997). Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *The Journal of experimental medicine* 186, 439-448.
- Funaro, A., Morra, M., Calosso, L., Zini, M.G., Ausiello, C.M., and Malavasi, F. (1997). Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation. *Tissue antigens* 49, 7-15.
- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *The Journal of cell biology* 127, 1617-1626.
- Gallatin, W.M., Weissman, I.L., and Butcher, E.C. (1983). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304, 30-34.
- Geffroy-Luseau, A., Jegou, G., Bataille, R., Campion, L., and Pellat-Deceunynck, C. (2008). Osteoclasts support the survival of human plasma cells in vitro. *International immunology* 20, 775-782.
- Goitsuka, R., Fujimura, Y., Mamada, H., Umeda, A., Morimura, T., Uetsuka, K., Doi, K., Tsuji, S., and Kitamura, D. (1998). BASH, a novel signaling molecule preferentially expressed in B cells of the bursa of Fabricius. *Journal of immunology* 161, 5804-5808.
- Good, K.L., Avery, D.T., and Tangye, S.G. (2009). Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *Journal of immunology* 182, 890-901.
- Goodison, S., Urquidí, V., and Tarin, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Molecular pathology* : MP 52, 189-196.
- Green, D.R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102, 1-4.
- Green, D.R. (2003). Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunological reviews* 193, 5-9.
- Green, D.R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121, 671-674.
- Guezguez, B., Vigneron, P., Lamerant, N., Kieda, C., Jaffredo, T., and Dunon, D. (2007). Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. *Journal of immunology* 179, 6673-6685.
- Hamann, A., Jablonski-Westrich, D., Jonas, P., and Thiele, H.G. (1991). Homing receptors reexamined: mouse LECAM-1 (MEL-14 antigen) is involved in lymphocyte migration into gut-associated lymphoid tissue. *European journal of immunology* 21, 2925-2929.
- Harada, H., Kawano, M.M., Huang, N., Harada, Y., Iwato, K., Tanabe, O., Tanaka, H., Sakai, A., Asaoku, H., and Kuramoto, A. (1993). Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 81, 2658-2663.
- Hargreaves, D.C., Hyman, P.L., Lu, T.T., Ngo, V.N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y.R., Littman, D.R., and Cyster, J.G. (2001). A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *The Journal of experimental medicine* 194, 45-56.



- Hasbold, J., Corcoran, L.M., Tarlinton, D.M., Tangye, S.G., and Hodgkin, P.D. (2004). Evidence from the generation of immunoglobulin G-secreting cells that stochastic mechanisms regulate lymphocyte differentiation. *Nature immunology* 5, 55-63.
- Hauser, A.E., Debes, G.F., Arce, S., Cassese, G., Hamann, A., Radbruch, A., and Manz, R.A. (2002). Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *Journal of immunology* 169, 1277-1282.
- Hippen, K.L., Buhl, A.M., D'Ambrosio, D., Nakamura, K., Persin, C., and Cambier, J.C. (1997). Fc gammaRIIB1 inhibition of BCR-mediated phosphoinositide hydrolysis and Ca<sup>2+</sup> mobilization is integrated by CD19 dephosphorylation. *Immunity* 7, 49-58.
- Hofmann, I., Mertens, C., Brettel, M., Nimmrich, V., Schnolzer, M., and Herrmann, H. (2000). Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *Journal of cell science* 113 ( Pt 13), 2471-2483.
- Hopkinson, S.B., and Jones, J.C. (2000). The N terminus of the transmembrane protein BP180 interacts with the N-terminal domain of BP230, thereby mediating keratin cytoskeleton anchorage to the cell surface at the site of the hemidesmosome. *Molecular biology of the cell* 11, 277-286.
- Hoyer, B.F., Moser, K., Hauser, A.E., Peddinghaus, A., Voigt, C., Eilat, D., Radbruch, A., Hiepe, F., and Manz, R.A. (2004). Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. *The Journal of experimental medicine* 199, 1577-1584.
- Hsu, M.C., Toellner, K.M., Vinuesa, C.G., and MacLennan, I.C. (2006). B cell clones that sustain long-term plasmablast growth in T-independent extrafollicular antibody responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5905-5910.
- Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009a). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research* 37, 1-13.
- Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009b). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 4, 44-57.
- Huard, B., McKee, T., Bosshard, C., Durual, S., Matthes, T., Myit, S., Donze, O., Frossard, C., Chizzolini, C., Favre, C., *et al.* (2008). APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *The Journal of clinical investigation* 118, 2887-2895.
- Hulett, H.R., Bonner, W.A., Barrett, J., and Herzenberg, L.A. (1969). Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 166, 747-749.
- Humphries, L.A., Dangelmaier, C., Sommer, K., Kipp, K., Kato, R.M., Griffith, N., Bakman, I., Turk, C.W., Daniel, J.L., and Rawlings, D.J. (2004). Tec kinases mediate sustained calcium influx via site-specific tyrosine phosphorylation of the phospholipase Cgamma Src homology 2-Src homology 3 linker. *The Journal of biological chemistry* 279, 37651-37661.
- Husmann, M., Pietsch, T., Fleischer, B., Weisgerber, C., and Bitter-Suermann, D. (1989). Embryonic neural cell adhesion molecules on human natural killer cells. *European journal of immunology* 19, 1761-1763.
- Hutcheson, J., Scatizzi, J.C., Siddiqui, A.M., Haines, G.K., 3rd, Wu, T., Li, Q.Z., Davis, L.S., Mohan, C., and Perlman, H. (2008). Combined deficiency of proapoptotic regulators Bim and Fas results in the early onset of systemic autoimmunity. *Immunity* 28, 206-217.
- Ihrie, R.A., Marques, M.R., Nguyen, B.T., Horner, J.S., Papazoglu, C., Bronson, R.T., Mills, A.A., and Attardi, L.D. (2005). Perp is a p63-regulated gene essential for epithelial integrity. *Cell* 120, 843-856.
- Inaoki, M., Sato, S., Weintraub, B.C., Goodnow, C.C., and Tedder, T.F. (1997). CD19-regulated signaling thresholds control peripheral tolerance and autoantibody production in B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 186, 1923-1931.

- Ishikawa, H., Tsuyama, N., Mahmoud, M.S., Fujii, R., Abroun, S., Liu, S., Li, F.J., and Kawano, M.M. (2002). CD19 expression and growth inhibition of tumours in human multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma* 43, 613-616.
- Isnardi, I., Bruhns, P., Bismuth, G., Fridman, W.H., and Daeron, M. (2006). The SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP1 is recruited to the intracytoplasmic domain of human FcγRIIB and is mandatory for negative regulation of B cell activation. *Immunology letters* 104, 156-165.
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., and Tsukita, S. (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to α catenin and actin filaments. *The Journal of cell biology* 138, 181-192.
- Jackson, N., Ling, N.R., Ball, J., Bromidge, E., Nathan, P.D., and Franklin, I.M. (1988). An analysis of myeloma plasma cell phenotype using antibodies defined at the IIIrd International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Clinical and experimental immunology* 72, 351-356.
- Janatpour, M.J., Hudak, S., Sathe, M., Sedgwick, J.D., and McEvoy, L.M. (2001). Tumor necrosis factor-dependent segmental control of MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment. *The Journal of experimental medicine* 194, 1375-1384.
- Jourdan, M., Reme, T., Goldschmidt, H., Fiol, G., Pantesco, V., De Vos, J., Rossi, J.F., Hose, D., and Klein, B. (2009). Gene expression of anti- and pro-apoptotic proteins in malignant and normal plasma cells. *British journal of haematology* 145, 45-58.
- Justement, L.B., Campbell, K.S., Chien, N.C., and Cambier, J.C. (1991). Regulation of B cell antigen receptor signal transduction and phosphorylation by CD45. *Science* 252, 1839-1842.
- Kabashima, K., Haynes, N.M., Xu, Y., Nutt, S.L., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2006). Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. *The Journal of experimental medicine* 203, 2683-2690.
- Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B.S., Lew, A.M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., *et al.* (2007). Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* 26, 555-566.
- Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D.M., Dietrich, W., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2004). Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *The Journal of experimental medicine* 200, 967-977.
- Kaminski, D.A., Wei, C., Qian, Y., Rosenberg, A.F., and Sanz, I. (2012). Advances in human B cell phenotypic profiling. *Frontiers in immunology* 3, 302.
- Kantele, A., Hakkinen, M., Moldoveanu, Z., Lu, A., Savilahti, E., Alvarez, R.D., Michalek, S., and Mestecky, J. (1998). Differences in immune responses induced by oral and rectal immunizations with *Salmonella typhi* Ty21a: evidence for compartmentalization within the common mucosal immune system in humans. *Infection and immunity* 66, 5630-5635.
- Karnell, J.L., Dimasi, N., Karnell, F.G., 3rd, Fleming, R., Kuta, E., Wilson, M., Wu, H., Gao, C., Herbst, R., and Ettinger, R. (2014). CD19 and CD32b differentially regulate human B cell responsiveness. *Journal of immunology* 192, 1480-1490.
- Kawamoto, T. (2003). Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Archives of histology and cytology* 66, 123-143.
- Kawamoto, T., and Kawamoto, K. (2014). Preparation of thin frozen sections from nonfixed and undecalcified hard tissues using Kawamoto's film method (2012). *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 1130, 149-164.
- Kawano, M.M., Mihara, K., Tsujimoto, T., Huang, N., and Kuramoto, A. (1995). A new phenotypic classification of bone marrow plasmacytosis. *International journal of hematology* 61, 179-188.
- Kishimoto, T., Miyake, T., Nishizawa, Y., Watanabe, T., and Yamamura, Y. (1975). Triggering mechanism of B lymphocytes. I. Effect of anti-immunoglobulin and enhancing soluble factor on differentiation and proliferation of B cells. *Journal of immunology* 115, 1179-1184.

- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nature immunology* 7, 773-782.
- Kozbor, D., Moretta, A., Messner, H.A., Moretta, L., and Croce, C.M. (1987). Tp44 molecules involved in antigen-independent T cell activation are expressed on human plasma cells. *Journal of immunology* 138, 4128-4132.
- Kozmik, Z., Wang, S., Dorfler, P., Adams, B., and Busslinger, M. (1992). The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Molecular and cellular biology* 12, 2662-2672.
- Kruisbeek, A.M. (1999). Introduction: regulation of T cell development by the thymic microenvironment. *Seminars in immunology* 11, 1-2.
- Kruisbeek, A.M., and Amsen, D. (1996). Mechanisms underlying T-cell tolerance. *Current opinion in immunology* 8, 233-244.
- Kunkel, E.J., and Butcher, E.C. (2003). Plasma-cell homing. *Nature reviews Immunology* 3, 822-829.
- Kurosaki, T. (1999). Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annual review of immunology* 17, 555-592.
- Kurosaki, T., and Kurosaki, M. (1997). Transphosphorylation of Bruton's tyrosine kinase on tyrosine 551 is critical for B cell antigen receptor function. *The Journal of biological chemistry* 272, 15595-15598.
- Lacotte, S., Decossas, M., Le Coz, C., Brun, S., Muller, S., and Dumortier, H. (2013). Early differentiated CD138(high) MHCII+ IgG+ plasma cells express CXCR3 and localize into inflamed kidneys of lupus mice. *PloS one* 8, e58140.
- Leung, K.T., Chan, K.Y., Ng, P.C., Lau, T.K., Chiu, W.M., Tsang, K.S., Li, C.K., Kong, C.K., and Li, K. (2011). The tetraspanin CD9 regulates migration, adhesion, and homing of human cord blood CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 117, 1840-1850.
- Liberzon, A., Subramanian, A., Pinchback, R., Thorvaldsdottir, H., Tamayo, P., and Mesirov, J.P. (2011). Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics* 27, 1739-1740.
- Lien, E., and Ingalls, R.R. (2002). Toll-like receptors. *Critical care medicine* 30, S1-11.
- Liesegang, B., Radbruch, A., and Rajewsky, K. (1978). Isolation of myeloma variants with predefined variant surface immunoglobulin by cell sorting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 3901-3905.
- Lin, K.I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., and Calame, K. (2002). Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Molecular and cellular biology* 22, 4771-4780.
- Lin, L., Gerth, A.J., and Peng, S.L. (2004). Active inhibition of plasma cell development in resting B cells by microphthalmia-associated transcription factor. *The Journal of experimental medicine* 200, 115-122.
- Lin, Y., Wong, K., and Calame, K. (1997). Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 276, 596-599.
- Linderson, Y., Eberhard, D., Malin, S., Johansson, A., Busslinger, M., and Pettersson, S. (2004). Corecruitment of the Grg4 repressor by PU.1 is critical for Pax5-mediated repression of B-cell-specific genes. *EMBO reports* 5, 291-296.
- Liu, D., Lin, P., Hu, Y., Zhou, Y., Tang, G., Powers, L., Medeiros, L.J., Jorgensen, J.L., and Wang, S.A. (2012). Immunophenotypic heterogeneity of normal plasma cells: comparison with minimal residual plasma cell myeloma. *Journal of clinical pathology* 65, 823-829.
- Livak, F., and Petrie, H.T. (2001). Somatic generation of antigen-receptor diversity: a reprise. *Trends in immunology* 22, 608-612.
- Luque, R., Brieva, J.A., Moreno, A., Manzanal, A., Escribano, L., Villarrubia, J., Velasco, J.L., Lopez-Jimenez, J., Cervero, C., Otero, M.J., *et al.* (1998). Normal and clonal B lineage cells can be distinguished by their differential expression of B cell antigens and adhesion molecules

- in peripheral blood from multiple myeloma (MM) patients--diagnostic and clinical implications. *Clinical and experimental immunology* **112**, 410-418.
- MacLennan, I.C. (1994). Somatic mutation. From the dark zone to the light. *Current biology* : CB **4**, 70-72.
  - Mali, M., Jaakkola, P., Arvilommi, A.M., and Jalkanen, M. (1990). Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans. *The Journal of biological chemistry* **265**, 6884-6889.
  - Manz, R.A., Arce, S., Cassese, G., Hauser, A.E., Hiepe, F., and Radbruch, A. (2002). Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Current opinion in immunology* **14**, 517-521.
  - Manz, R.A., Hauser, A.E., Hiepe, F., and Radbruch, A. (2005). Maintenance of serum antibody levels. *Annual review of immunology* **23**, 367-386.
  - Manz, R.A., Lohning, M., Cassese, G., Thiel, A., and Radbruch, A. (1998). Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *International immunology* **10**, 1703-1711.
  - Manz, R.A., Thiel, A., and Radbruch, A. (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* **388**, 133-134.
  - Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355-360.
  - Matthes, T., Dunand-Sauthier, I., Santiago-Raber, M.L., Krause, K.H., Donze, O., Passweg, J., McKee, T., and Huard, B. (2011). Production of the plasma-cell survival factor a proliferation-inducing ligand (APRIL) peaks in myeloid precursor cells from human bone marrow. *Blood* **118**, 1838-1844.
  - McEver, R.P., and Zhu, C. (2010). Rolling cell adhesion. *Annual review of cell and developmental biology* **26**, 363-396.
  - Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., Gonzalez-Garcia, I., and Brieva, J.A. (2002). The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* **99**, 2154-2161.
  - Mei, H.E., Yoshida, T., Muehlinghaus, G., Hiepe, F., Dörner, T., Radbruch, A., and Hoyer, B.F. (2007). Phenotypic analysis of B-cells and plasma cells. *Methods in molecular medicine* **136**, 3-18.
  - Mei, H.E., Yoshida, T., Sime, W., Hiepe, F., Thiele, K., Manz, R.A., Radbruch, A., and Dörner, T. (2009a). Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood* **113**, 2461-2469.
  - Mei, H.E., Wirries, I., Frölich, D., Brisslert, M., Giesecke, C., Grun, J.R., Alexander, T., Schmidt, S., Luda, K., Kuhl, A.A., *et al.* (2015). A unique population of IgG-expressing plasma cells lacking CD19 is enriched in human bone marrow. *Blood*. 2015 Jan 8.
  - Menssen, A., Edinger, G., Grun, J.R., Haase, U., Baumgrass, R., Grutzkau, A., Radbruch, A., Burmester, G.R., and Haupl, T. (2009). SiPaGene: A new repository for instant online retrieval, sharing and meta-analyses of GeneChip expression data. *BMC genomics* **10**, 98.
  - Minges Wols, H.A., Ippolito, J.A., Yu, Z., Palmer, J.L., White, F.A., Le, P.T., and Witte, P.L. (2007). The effects of microenvironment and internal programming on plasma cell survival. *International immunology* **19**, 837-846.
  - Minges Wols, H.A., Underhill, G.H., Kansas, G.S., and Witte, P.L. (2002). The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *Journal of immunology* **169**, 4213-4221.
  - Mire-Sluis, A.R., Das, R.G., and Padilla, A. (1998). WHO cytokine standardization: facilitating the development of cytokines in research, diagnosis and as therapeutic agents. *Journal of immunological methods* **216**, 103-116.
  - Moreaux, J., Sprynski, A.C., Dillon, S.R., Mahtouk, K., Jourdan, M., Ythier, A., Moine, P., Robert, N., Jourdan, E., Rossi, J.F., *et al.* (2009). APRIL and TACI interact with syndecan-1

- on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop. *European journal of haematology* 83, 119-129.
- Muto, A., Ochiai, K., Kimura, Y., Itoh-Nakadai, A., Calame, K.L., Ikebe, D., Tashiro, S., and Igarashi, K. (2010). Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch. *The EMBO journal* 29, 4048-4061.
  - Muto, A., Tashiro, S., Nakajima, O., Hoshino, H., Takahashi, S., Sakoda, E., Ikebe, D., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (2004). The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* 429, 566-571.
  - Nadler, L.M., Korsmeyer, S.J., Anderson, K.C., Boyd, A.W., Slaughenhaupt, B., Park, E., Jensen, J., Coral, F., Mayer, R.J., Sallan, S.E., *et al.* (1984). B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation. *The Journal of clinical investigation* 74, 332-340.
  - Nair, J.R., Carlson, L.M., Koorella, C., Rozanski, C.H., Byrne, G.E., Bergsagel, P.L., Shaughnessy, J.P., Jr., Boise, L.H., Chanan-Khan, A., and Lee, K.P. (2011). CD28 expressed on malignant plasma cells induces a prosurvival and immunosuppressive microenvironment. *Journal of immunology* 187, 1243-1253.
  - Nakayama, T., Hieshima, K., Izawa, D., Tatsumi, Y., Kanamaru, A., and Yoshie, O. (2003). Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *Journal of immunology* 170, 1136-1140.
  - Nera, K.P., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Koskela, K., Buerstedde, J.M., and Lassila, O. (2006). Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity* 24, 283-293.
  - Nicholson, B.J. (2003). Gap junctions - from cell to molecule. *Journal of cell science* 116, 4479-4481.
  - Nitschke, L., Carsetti, R., Ocker, B., Kohler, G., and Lamers, M.C. (1997). CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Current biology : CB* 7, 133-143.
  - Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556-562.
  - O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., and Noelle, R.J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *The Journal of experimental medicine* 199, 91-98.
  - O'Keefe, T.L., Williams, G.T., Batista, F.D., and Neuberger, M.S. (1999). Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *The Journal of experimental medicine* 189, 1307-1313.
  - Obukhanych, T.V., and Nussenzweig, M.C. (2006). T-independent type II immune responses generate memory B cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 305-310.
  - Ochsenbein, A.F., Pinschewer, D.D., Sierro, S., Horvath, E., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13263-13268.
  - Odendahl, M., Mei, H., Hoyer, B.F., Jacobi, A.M., Hansen, A., Muehlinghaus, G., Berek, C., Hiepe, F., Manz, R., Radbruch, A., *et al.* (2005). Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 105, 1614-1621.
  - Ono, M., Bolland, S., Tempst, P., and Ravetch, J.V. (1996). Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature* 383, 263-266.
  - Ono, M., Okada, H., Bolland, S., Yanagi, S., Kurosaki, T., and Ravetch, J.V. (1997). Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell* 90, 293-301.
  - Orlinick, J.R., and Chao, M.V. (1998). TNF-related ligands and their receptors. *Cellular signalling* 10, 543-551.

- Ozaki, K., Spolski, R., Ettinger, R., Kim, H.P., Wang, G., Qi, C.F., Hwu, P., Shaffer, D.J., Akilesh, S., Roopenian, D.C., *et al.* (2004). Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *Journal of immunology* 173, 5361-5371.
- Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C.G., Qi, C.F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H.C., 3rd, Liu, C., Schwartzberg, P.L., and Leonard, W.J. (2002). A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298, 1630-1634.
- Parkin, J., and Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet* 357, 1777-1789.
- Parsons, J.T., Horwitz, A.R., and Schwartz, M.A. (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 633-643.
- Pauls, S.D., Lafarge, S.T., Landego, I., Zhang, T., and Marshall, A.J. (2012). The phosphoinositide 3-kinase signaling pathway in normal and malignant B cells: activation mechanisms, regulation and impact on cellular functions. *Frontiers in immunology* 3, 224.
- Paus, D., Phan, T.G., Chan, T.D., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2006). Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *The Journal of experimental medicine* 203, 1081-1091.
- Peceliunas, V., Janiulioniene, A., Matuzeviciene, R., and Griskevicius, L. (2011). Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* 80, 318-323.
- Peled, A., Grabovsky, V., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Petit, I., Ben-Hur, H., Lapidot, T., and Alon, R. (1999). The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *The Journal of clinical investigation* 104, 1199-1211.
- Pellat-Deceunynck, C., and Bataille, R. (2004). Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood cells, molecules & diseases* 32, 293-301.
- Pellat-Deceunynck, C., Bataille, R., Robillard, N., Harousseau, J.L., Rapp, M.J., Juge-Morineau, N., Wijdenes, J., and Amiot, M. (1994). Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood* 84, 2597-2603.
- Peperzak, V., Vikstrom, I., Walker, J., Glaser, S.P., LePage, M., Coquery, C.M., Erickson, L.D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., *et al.* (2013). Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells. *Nature immunology* 14, 290-297.
- Phee, H., Rodgers, W., and Coggeshall, K.M. (2001). Visualization of negative signaling in B cells by quantitative confocal microscopy. *Molecular and cellular biology* 21, 8615-8625.
- Phillips, N.E., and Parker, D.C. (1983). Fc-dependent inhibition of mouse B cell activation by whole anti-mu antibodies. *Journal of immunology* 130, 602-606.
- Pihlgren, M., Friedli, M., Tougne, C., Rochat, A.F., Lambert, P.H., and Siegrist, C.A. (2006). Reduced ability of neonatal and early-life bone marrow stromal cells to support plasmablast survival. *Journal of immunology* 176, 165-172.
- Pihlgren, M., Schallert, N., Tougne, C., Bozzotti, P., Kovarik, J., Fulurija, A., Kosco-Vilbois, M., Lambert, P.H., and Siegrist, C.A. (2001). Delayed and deficient establishment of the long-term bone marrow plasma cell pool during early life. *European journal of immunology* 31, 939-946.
- Pinkoski, M.J., and Green, D.R. (2002). Lymphocyte apoptosis: refining the paths to perdition. *Current opinion in hematology* 9, 43-49.
- Pinto, D., Montani, E., Bolli, M., Garavaglia, G., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Jarrossay, D. (2013). A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood* 121, 4110-4114.
- Poe, J.C., Fujimoto, M., Jansen, P.J., Miller, A.S., and Tedder, T.F. (2000). CD22 forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc. A pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux. *The Journal of biological chemistry* 275, 17420-17427.
- Quarona, V., Zaccarello, G., Chillemi, A., Brunetti, E., Singh, V.K., Ferrero, E., Funaro, A., Horenstein, A.L., and Malavasi, F. (2013). CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* 84, 207-217.

- Radbruch, A., Muehlinghaus, G., Luger, E.O., Inamine, A., Smith, K.G., Dörner, T., and Hiepe, F. (2006). Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature reviews Immunology* 6, 741-750.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Ravetch, J.V., and Bolland, S. (2001). IgG Fc receptors. *Annual review of immunology* 19, 275-290.
- Rawlings, D.J., Saffran, D.C., Tsukada, S., Largaespada, D.A., Grimaldi, J.C., Cohen, L., Mohr, R.N., Bazan, J.F., Howard, M., Copeland, N.G., *et al.* (1993). Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* 261, 358-361.
- Rawstron, A., Barrans, S., Blythe, D., Davies, F., English, A., Pratt, G., Child, A., Morgan, G., and Jack, A. (1999). Distribution of myeloma plasma cells in peripheral blood and bone marrow correlates with CD56 expression. *British journal of haematology* 104, 138-143.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., and Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300-307.
- Reimold, A.M., Ponath, P.D., Li, Y.S., Hardy, R.R., David, C.S., Strominger, J.L., and Glimcher, L.H. (1996). Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *The Journal of experimental medicine* 183, 393-401.
- Reljic, R., Wagner, S.D., Peakman, L.J., and Fearon, D.T. (2000). Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *The Journal of experimental medicine* 192, 1841-1848.
- Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* 338, 383-384.
- Reth, M., and Wienands, J. (1997). Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annual review of immunology* 15, 453-479.
- Ribatti, D., Crivellato, E., and Vacca, A. (2006). The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage. *Clinical and experimental immunology* 145, 1-4.
- Rickert, R.C., Rajewsky, K., and Roes, J. (1995). Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* 376, 352-355.
- Rinkenberger, J.L., Wallin, J.J., Johnson, K.W., and Koshland, M.E. (1996). An interleukin-2 signal relieves BSAP (Pax5)-mediated repression of the immunoglobulin J chain gene. *Immunity* 5, 377-386.
- Rodriguez Gomez, M., Talke, Y., Goebel, N., Hermann, F., Reich, B., and Mack, M. (2010). Basophils support the survival of plasma cells in mice. *Journal of immunology* 185, 7180-7185.
- Roldan, E., Garcia-Pardo, A., and Brieva, J.A. (1992). VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. *The Journal of experimental medicine* 175, 1739-1747.
- Roque, M.C., Smith, P.A., and Blasquez, V.C. (1996). A developmentally modulated chromatin structure at the mouse immunoglobulin kappa 3' enhancer. *Molecular and cellular biology* 16, 3138-3155.
- Roth, K., Oehme, L., Zehentmeier, S., Zhang, Y., Niesner, R., and Hauser, A.E. (2014). Tracking plasma cell differentiation and survival. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 85, 15-24.
- Rozanski, C.H., Arens, R., Carlson, L.M., Nair, J., Boise, L.H., Chanan-Khan, A.A., Schoenberger, S.P., and Lee, K.P. (2011). Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *The Journal of experimental medicine* 208, 1435-1446.
- Sahara, N., and Takeshita, A. (2004). Prognostic significance of surface markers expressed in multiple myeloma: CD56 and other antigens. *Leukemia & lymphoma* 45, 61-65.

- Salim, K., Bottomley, M.J., Querfurth, E., Zvelebil, M.J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R.L., Gigg, R., Smith, C.I., Driscoll, P.C., *et al.* (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *The EMBO journal* 15, 6241-6250.
- Sato, S., Jansen, P.J., and Tedder, T.F. (1997). CD19 and CD22 expression reciprocally regulates tyrosine phosphorylation of Vav protein during B lymphocyte signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 13158-13162.
- Scharenberg, A.M., Humphries, L.A., and Rawlings, D.J. (2007). Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nature reviews Immunology* 7, 778-789.
- Schebesta, A., McManus, S., Salvagiotto, G., Delogu, A., Busslinger, G.A., and Busslinger, M. (2007). Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity* 27, 49-63.
- Schebesta, M., Heavey, B., and Busslinger, M. (2002). Transcriptional control of B-cell development. *Current opinion in immunology* 14, 216-223.
- Schenkel, A.R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R.M., and Muller, W.A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nature immunology* 3, 143-150.
- Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* 182, 311-322.
- Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M., and Singh, H. (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* 25, 225-236.
- Seol, H.J., Chang, J.H., Yamamoto, J., Romagnuolo, R., Suh, Y., Weeks, A., Agnihotri, S., Smith, C.A., and Rutka, J.T. (2012). Overexpression of CD99 Increases the Migration and Invasiveness of Human Malignant Glioma Cells. *Genes & cancer* 3, 535-549.
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltzane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., *et al.* (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51-62.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., *et al.* (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 21, 81-93.
- Shaffer, A.L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P., and Staudt, L.M. (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 13, 199-212.
- Shapiro-Shelef, M., and Calame, K. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nature reviews Immunology* 5, 230-242.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G., and Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19, 607-620.
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., Savitsky, D., Liao, J., and Calame, K. (2005). Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. *The Journal of experimental medicine* 202, 1471-1476.
- Sharma, K., Wang, R.X., Zhang, L.Y., Yin, D.L., Luo, X.Y., Solomon, J.C., Jiang, R.F., Markos, K., Davidson, W., Scott, D.W., *et al.* (2000). Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacology & therapeutics* 88, 333-347.
- Shlomchik, M.J., and Weisel, F. (2012). Germinal centers. *Immunological reviews* 247, 5-10.
- Simmons, D.L., Tan, S., Tenen, D.G., Nicholson-Weller, A., and Seed, B. (1989). Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 73, 284-289.
- Slifka, M.K., and Ahmed, R. (1998). Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Current opinion in immunology* 10, 252-258.



- Slifka, M.K., Antia, R., Whitmire, J.K., and Ahmed, R. (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8, 363-372.
- Slifka, M.K., Matloubian, M., and Ahmed, R. (1995). Bone marrow is a major site of long-term antibody production after acute viral infection. *Journal of virology* 69, 1895-1902.
- Smiljanovic, B., Grun, J.R., Steinbrich-Zollner, M., Stuhlmüller, B., Haupl, T., Burmester, G.R., Radbruch, A., Grutzkau, A., and Baumgrass, R. (2010). Defining TNF- $\alpha$ - and LPS-induced gene signatures in monocytes to unravel the complexity of peripheral blood transcriptomes in health and disease. *Journal of molecular medicine* 88, 1065-1079.
- Smith, K.G., Hewitson, T.D., Nossal, G.J., and Tarlinton, D.M. (1996). The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *European journal of immunology* 26, 444-448.
- Smith, K.G., Tarlinton, D.M., Doody, G.M., Hibbs, M.L., and Fearon, D.T. (1998). Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn. *The Journal of experimental medicine* 187, 807-811.
- Starke, C., Frey, S., Wellmann, U., Urbonaviciute, V., Herrmann, M., Amann, K., Schett, G., Winkler, T., and Voll, R.E. (2011). High frequency of autoantibody-secreting cells and long-lived plasma cells within inflamed kidneys of NZB/W F1 lupus mice. *European journal of immunology* 41, 2107-2112.
- Steed, E., Balda, M.S., and Matter, K. (2010). Dynamics and functions of tight junctions. *Trends in cell biology* 20, 142-149.
- Steinberg, M.S., Shida, H., Giudice, G.J., Shida, M., Patel, N.H., and Blaschuk, O.W. (1987). On the molecular organization, diversity and functions of desmosomal proteins. *Ciba Foundation symposium* 125, 3-25.
- Steinke, J.W., and Borish, L. (2006). 3. Cytokines and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 117, S441-445.
- Stevens, R.H., Macy, E., Morrow, C., and Saxon, A. (1979). Characterization of a circulating subpopulation of spontaneous antitetanus toxoid antibody producing B cells following in vivo booster immunization. *Journal of immunology* 122, 2498-2504.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., *et al.* (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15545-15550.
- Taillardet, M., Haffar, G., Mondiere, P., Asensio, M.J., Gheit, H., Burdin, N., Defrance, T., and Genestier, L. (2009). The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood* 114, 4432-4440.
- Tangye, S.G. (2011). Staying alive: regulation of plasma cell survival. *Trends in immunology* 32, 595-602.
- Tangye, S.G., Avery, D.T., Deenick, E.K., and Hodgkin, P.D. (2003). Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *Journal of immunology* 170, 686-694.
- Tarlinton, D.M., and Smith, K.G. (2000). Dissecting affinity maturation: a model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. *Immunology today* 21, 436-441.
- Tarte, K., Zhan, F., De Vos, J., Klein, B., and Shaughnessy, J., Jr. (2003). Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood* 102, 592-600.
- Tedder, T.F., Inaoki, M., and Sato, S. (1997). The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 6, 107-118.
- Tedder, T.F., Zhou, L.J., and Engel, P. (1994). The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunology today* 15, 437-442.
- Tellier, J., and Kallies, A. (2014). Finding a home for plasma cells--a niche to survive. *European journal of immunology* 44, 2243-2246.

- Terstappen, L.W., Johnsen, S., Segers-Nolten, I.M., and Loken, M.R. (1990). Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 76, 1739-1747.
- Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cellular signalling* 16, 139-144.
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20, 707-718.
- Tokoyoda, K., Hauser, A.E., Nakayama, T., and Radbruch, A. (2010). Organization of immunological memory by bone marrow stroma. *Nature reviews Immunology* 10, 193-200.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Tony, H.P., and Schimpl, A. (1980). Stimulation of murine B cells with anti-Ig antibodies: dominance of a negative signal mediated by the Fc receptor. *European journal of immunology* 10, 726-729.
- Tooze, R.M. (2013). A replicative self-renewal model for long-lived plasma cells: questioning irreversible cell cycle exit. *Frontiers in immunology* 4, 460.
- Tormin, A., Li, O., Brune, J.C., Walsh, S., Schutz, B., Ehinger, M., Ditzel, N., Kassem, M., and Scheduling, S. (2011). CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood* 117, 5067-5077.
- Traggiai, E., Puzone, R., and Lanzavecchia, A. (2003). Antigen dependent and independent mechanisms that sustain serum antibody levels. *Vaccine* 21 Suppl 2, S35-37.
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305.
- Treanor, B. (2012). B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology* 136, 21-27.
- Trepel, F. (1974). Number and distribution of lymphocytes in man. A critical analysis. *Klinische Wochenschrift* 52, 511-515.
- Tridandapani, S., Kelley, T., Pradhan, M., Cooney, D., Justement, L.B., and Coggeshall, K.M. (1997). Recruitment and phosphorylation of SH2-containing inositol phosphatase and Shc to the B-cell Fc gamma immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif peptide motif. *Molecular and cellular biology* 17, 4305-4311.
- Tunyaplin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M., and Calame, K.L. (2004). Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *Journal of immunology* 173, 1158-1165.
- Turner, C.A., Jr., Mack, D.H., and Davis, M.M. (1994). Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77, 297-306.
- Vallerskog, T., Gunnarsson, I., Widhe, M., Risselada, A., Klareskog, L., van Vollenhoven, R., Malmstrom, V., and Trollmo, C. (2007). Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 122, 62-74.
- Van Camp, B., Durie, B.G., Spier, C., De Waele, M., Van Riet, I., Vela, E., Frutiger, Y., Richter, L., and Grogan, T.M. (1990). Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood* 76, 377-382.
- Van Riet, I., De Waele, M., Remels, L., Lacor, P., Schots, R., and Van Camp, B. (1991). Expression of cytoadhesion molecules (CD56, CD54, CD18 and CD29) by myeloma plasma cells. *British journal of haematology* 79, 421-427.
- van Zelm, M.C., Reisli, I., van der Burg, M., Castano, D., van Noesel, C.J., van Tol, M.J., Woellner, C., Grimbacher, B., Patino, P.J., van Dongen, J.J., *et al.* (2006). An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *The New England journal of medicine* 354, 1901-1912.

- Vargas, F., Tolosa, E., Sospedra, M., Catalfamo, M., Lucas-Martin, A., Obiols, G., and Pujol-Borrell, R. (1994). Characterization of neural cell adhesion molecule (NCAM) expression in thyroid follicular cells: induction by cytokines and over-expression in autoimmune glands. *Clinical and experimental immunology* 98, 478-488.
- Veri, M.C., Gorlatov, S., Li, H., Burke, S., Johnson, S., Stavenhagen, J., Stein, K.E., Bonvini, E., and Koenig, S. (2007). Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcγ-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcγ-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology* 121, 392-404.
- Vestweber, D. (2007). Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunological reviews* 218, 178-196.
- Vieira, P., and Rajewsky, K. (1988). The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *European journal of immunology* 18, 313-316.
- Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B., and Mackay, C.R. (2005). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nature reviews Immunology* 5, 853-865.
- Wang, Z., and Yan, X. (2013). CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer letters* 330, 150-162.
- Wienands, J., Schweikert, J., Wollscheid, B., Jumaa, H., Nielsen, P.J., and Reth, M. (1998). SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation. *The Journal of experimental medicine* 188, 791-795.
- Wilson, H.A., Greenblatt, D., Taylor, C.W., Putney, J.W., Tsien, R.Y., Finkelman, F.D., and Chused, T.M. (1987). The B lymphocyte calcium response to anti-Ig is diminished by membrane immunoglobulin cross-linkage to the Fc γ receptor. *Journal of immunology* 138, 1712-1718.
- Winkelmann, R., Sandrock, L., Porstner, M., Roth, E., Mathews, M., Hobeika, E., Reth, M., Kahn, M.L., Schuh, W., and Jäck, H.M. (2011). B cell homeostasis and plasma cell homing controlled by Kruppel-like factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 710-715.
- Winter, O., Moser, K., Mohr, E., Zotos, D., Kaminski, H., Szyska, M., Roth, K., Wong, D.M., Dame, C., Tarlinton, D.M., *et al.* (2010). Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow. *Blood* 116, 1867-1875.
- Wittmann, J., and Jäck, H.M. (2010). New surprises from the deep--the family of small regulatory RNAs increases. *TheScientificWorldJournal* 10, 1239-1243.
- Won, W.J., and Kearney, J.F. (2002). CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice. *Journal of immunology* 168, 5605-5611.
- Wortis, H.H. (1971). Immunological responses of 'nude' mice. *Clinical and experimental immunology* 8, 305-317.
- Xiang, Z., Cutler, A.J., Brownlie, R.J., Fairfax, K., Lawlor, K.E., Severinson, E., Walker, E.U., Manz, R.A., Tarlinton, D.M., and Smith, K.G. (2007). FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nature immunology* 8, 419-429.
- Yamamoto, H., Kishimoto, T., and Minamoto, S. (1998). NF-κB activation in CD27 signaling: involvement of TNF receptor-associated factors in its signaling and identification of functional region of CD27. *Journal of immunology* 161, 4753-4759.
- Yanez-Mo, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdes, M., and Sanchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends in cell biology* 19, 434-446.
- Ye, B.H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R.S., *et al.* (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nature genetics* 16, 161-170.
- Yonehara, S. (1999). Effects of anti-Fas antibodies on lymphocytes and other organs: preparation of original and new monoclonal antibodies and amelioration of systemic autoimmune disease. *International reviews of immunology* 18, 329-345.

- Yoon, S.O., Lee, I.Y., Zhang, X., Zapata, M.C., and Choi, Y.S. (2014). CD9 may contribute to the survival of human germinal center B cells by facilitating the interaction with follicular dendritic cells. *FEBS open bio* 4, 370-376.
- Yoon, S.O., Zhang, X., Lee, I.Y., Spencer, N., Vo, P., and Choi, Y.S. (2013). CD9 is a novel marker for plasma cell precursors in human germinal centers. *Biochemical and biophysical research communications* 431, 41-46.
- Yoshida, T., Mei, H., Dörner, T., Hiepe, F., Radbruch, A., Fillatreau, S., and Hoyer, B.F. (2010). Memory B and memory plasma cells. *Immunological reviews* 237, 117-139.
- Yu, C., Cantor, A.B., Yang, H., Browne, C., Wells, R.A., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2002). Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *The Journal of experimental medicine* 195, 1387-1395.
- Zehentmeier, S., Roth, K., Cseresnyes, Z., Sercan, O., Horn, K., Niesner, R.A., Chang, H.D., Radbruch, A., and Hauser, A.E. (2014). Static and dynamic components synergize to form a stable survival niche for bone marrow plasma cells. *European journal of immunology* 44, 2306-2317.
- Zhou, H., Ge, Y., Sun, L., Ma, W., Wu, J., Zhang, X., Hu, X., Eaves, C.J., Wu, D., and Zhao, Y. (2014). Growth arrest specific 2 is up-regulated in chronic myeloid leukemia cells and required for their growth. *PloS one* 9, e86195.
- Zhou, X., Huang, X., Huang, Z., Wang, Z., and Zhao, T. (2013). [CD99 regulates redifferentiation of classical Hodgkin's lymphoma cell line L428 towards B cells]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 33, 235-238.
- Zielinski, C.E., Corti, D., Mele, F., Pinto, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2011). Dissecting the human immunologic memory for pathogens. *Immunological reviews* 240, 40-51.
- Zinkernagel, R.M., Bachmann, M.F., Kundig, T.M., Oehen, S., Pirchet, H., and Hengartner, H. (1996). On immunological memory. *Annual review of immunology* 14, 333-367.

## Internetquellen:

- **Bioretis:** <http://www.bioretis-analysis.de>
- **miRanalyzer:** <http://bioinfo5.ugr.es/miRanalyzer/miRanalyzer.php>
- **RKI, Epidemiologisches Bulletin, 25. August 2014, Nr. 34:**  
[http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2014/Ausgaben/34\\_14.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2014/Ausgaben/34_14.pdf?__blob=publicationFile)
- [http://www.bdbiosciences.com/services/training/itf\\_launch.jsp](http://www.bdbiosciences.com/services/training/itf_launch.jsp), aufgerufen am 24. Juli 2014
- <http://www.biocarta.com/pathfiles/PathwayProteinList.asp?showPFID=149>, aufgerufen am 16. Mai 2014
- <http://www.biokurs.de/skripten/12/bs12-54.htm>, aufgerufen am 02. Oktober 2014
- <http://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd56.html>, aufgerufen am 28. Oktober 2014

## ANHANG

### Liste aller signifikant differenziell exprimierten Gene in CD19<sup>(-)</sup> versus CD19<sup>+</sup> KM PZ

**Tabelle 13: Liste aller signifikant differenziell exprimierten Gene in CD19<sup>+</sup> versus CD19<sup>(-)</sup> KM PZ.** Eine HPCDA (*high performance chip data analysis*)-Untersuchung der Genexpressionsdaten von CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren ergab nach Bonferroni-Korrektur insgesamt 859 differenziell exprimierte Affymetrix-Gensonden (IDs), die 689 verschiedenen Genen entsprechen. Ein positiver *fold change* (FC) bedeutet stärkere Expression in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, ein negativer FC entspricht stärkerer Expression in CD19<sup>+</sup> KM PZ. Der HPCDA-Wert wurde durch Dr. Joachim Grün (DRFZ, Berlin) ermittelt und kann als Maß für die Signifikanz der Analyse angesehen werden.

Affymetrix ID	Gensymbol	Bezeichnung	FC	HPCDA
218858_at	DEPDC6	DEP domain containing 6	5,18736	4051,83
203698_s_at	FRZB	frizzled-related protein	4,59479	3718,69
203697_at	FRZB	frizzled-related protein	6,19563	3381,55
202552_s_at	CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)	6,08919	2902,41
205442_at	MFAP3L	microfibrillar-associated protein 3-like	8,35419	2863,80
209868_s_at	RBMS1	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	3,716	2192,32
210942_s_at	ST3GAL6	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	6,24954	2120,26
218319_at	PELI1	pellino homolog 1 (Drosophila)	1,96564	1952,19
205848_at	GAS2	growth arrest-specific 2	4,81905	1922,10
211474_s_at	SERPINB6	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6	2,63902	1656,12
229147_at	RASSF6	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 6	4,6549	1628,24
223044_at	SLC40A1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	4,10534	1624,98
209210_s_at	FERMT2	pleckstrin homology domain containing, family C (with FERM domain) member 1	3,26312	1585,93
228218_at	BC041405	Homo sapiens, clone IMAGE:5284125, mRNA	3,36359	1578,46
202342_s_at	TRIM2	tripartite motif-containing 2	2,60494	1576,39
217901_at	DSG2	Desmoglein 2	7,17884	1563,98
209298_s_at	ITSN1	intersectin 1 (SH3 domain protein)	3,81386	1533,23
204670_x_at	hCG_1998957 /// HLA-DQB1 /// HLA-DQB2 /// HLA-DRB1 /// HLA-DRB2 /// HLA-DRB3 /// HLA-DRB4 /// HLA-DRB5	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	-3,5739	1476,08
215193_x_at	HLA-DRB1 /// HLA-DRB3	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	-3,1794	1472,82
218374_s_at	C12orf4	chromosome 12 open reading frame 4	-1,5092	1464,45
201427_s_at	SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1	2,75586	1443,34
243278_at	FOXP2	forkhead box P2	6,22252	1431,36
201360_at	CST2 /// CST3	cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage)	2,63902	1423,77
235518_at	SLC8A1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	4,06992	1418,23
208146_s_at	CPVL	carboxypeptidase, vitellogenic-like /// carboxypeptidase, vitellogenic-like	6,46993	1381,29
225202_at	RHOBTB3	Rho-related BTB domain containing 3	2,41999	1377,07
222392_x_at	PERP	PERP, TP53 apoptosis effector	1,69643	1321,02
213355_at	ST3GAL6	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	5,34708	1316,98
205569_at	LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3	2,26773	1301,77
213005_s_at	ANKRD15	ankyrin repeat domain 15	1,89868	1258,30
244370_at	KIAA2022	KIAA2022 protein	2,22877	1254,77

## Anhang

225269_s_at	RBMS1	chromosome 2 open reading frame 12	2,89036	1242,98
220595_at	PDZRN4	PDZ domain containing RING finger 4	4,96743	1209,05
235638_at	RASSF6	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 6	4,19523	1190,07
212254_s_at	DST	dystonin	2,47298	1189,68
225731_at	ANKRD50	KIAA1223 protein	7,1478	1144,24
208451_s_at	C4A /// C4B	complement component 4A /// complement component 4B /// complement component 4B, telomeric	4,06992	1135,18
212526_at	SPG20	spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome)	2,08855	1120,45
235201_at	FOXP2	forkhead box P2	8,79998	1102,03
206176_at	BMP6	bone morphogenetic protein 6	1,78695	1042,02
200771_at	LAMC1	laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	1,84197	1035,34
230175_s_at	DCBLD2	discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	4,989	1033,26
204059_s_at	ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	2,8162	1024,71
228155_at	C10orf58	chromosome 10 open reading frame 58	2,04379	1020,01
202011_at	TJP1	tight junction protein 1 (zona occludens 1)	3,89737	957,13
206478_at	KIAA0125	KIAA0125	1,54221	948,77
209708_at	MOXD1	monooxygenase, DBH-like 1	2,77984	945,20
228518_at	IGH@ /// IGHG1 /// IGHM	immunoglobulin heavy locus /// immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker) /// immunoglobulin heavy constant mu	2,17159	939,75
204602_at	DKK1	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	5,37029	937,49
225710_at	GNB4	CDNA FLJ34013 fis, clone FCBBF2002111	2,14355	922,94
208729_x_at	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	1,61748	897,67
206715_at	TFEC	transcription factor EC	3,78095	895,73
225265_at	RBMS1	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	2,25793	890,84
213093_at	PRKCA	protein kinase C, alpha	3,12477	871,51
215127_s_at	RBMS1	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	3,62065	870,92
212827_at	IGHM	immunoglobulin heavy constant mu /// immunoglobulin heavy constant mu	2,54912	860,23
239066_at	---	Transcribed locus, weakly similar to XP_521389.1 PREDICTED: similar to UTY [Pan troglodytes]	5,25522	860,19
215016_x_at	DST	dystonin	2,23845	835,47
221042_s_at	CLMN	calmin (calponin-like, transmembrane)	1,8823	816,83
219747_at	C4orf31	hypothetical protein FLJ23191	3,63637	806,84
213293_s_at	TRIM22	tripartite motif-containing 22	4,57493	790,16
230319_at	C4orf31	CDNA FLJ36413 fis, clone THYMU2010816	16,8538	772,31
207981_s_at	ESRRG	estrogen-related receptor gamma	3,3058	770,10
218976_at	DNAJC12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12	2,07952	758,91
205110_s_at	FGF13	fibroblast growth factor 13	5,58381	748,78
212900_at	SEC24A	SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)	-1,5692	748,26
207734_at	LAX1	lymphocyte transmembrane adaptor 1	-1,5289	741,42
221024_s_at	SLC2A10	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10 /// solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10	1,81033	734,52
226609_at	DCBLD1	discoidin, CUB and LCCL domain containing 1	1,93187	732,58
201649_at	UBE2L6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	-1,4452	730,54
213912_at	KIAA0984	KIAA0984 protein	2,22877	726,33
206121_at	AMPD1	adenosine monophosphate deaminase 1 (isoform M)	1,83401	725,85
220532_s_at	TMEM176B	LR8 protein	5,44054	724,90
225144_at	BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	1,6529	722,78
242134_at	---	Transcribed locus	2,07952	718,91
209312_x_at	HLA-DRB1 /// HLA-DRB2 /// HLA-DRB3 /// HLA-DRB4 /// HLA-DRB5 ///	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 /// major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	-3,3491	709,27
202946_s_at	BTBD3	BTB (POZ) domain containing 3	6,01056	707,54

## Anhang

217744_s_at	PERP	PERP, TP53 apoptosis effector	1,8823	705,87
211509_s_at	RTN4	reticulon 4	1,34257	703,21
222154_s_at	LOC26010	DNA polymerase-transactivated protein 6	2,80403	698,08
1554474_a_at	MOXD1	monooxygenase, DBH-like 1	2,40953	688,96
218675_at	SLC22A17	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 17	3,07109	687,00
218694_at	ARMCX1	armadillo repeat containing, X-linked 1	2,5713	671,61
202551_s_at	CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)	5,98458	670,25
206118_at	STAT4	signal transducer and activator of transcription 4	3,68394	669,02
227798_at	SMAD1	SMAD, mothers against DPP homolog 1 (Drosophila)	6,78571	668,97
207717_s_at	PKP2	plakophilin 2	9,72198	664,30
218888_s_at	NETO2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	-2,1905	663,48
204446_s_at	ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase	2,3579	647,12
211911_x_at	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B /// major histocompatibility complex, class I, B	1,68179	645,30
205174_s_at	QPCT	glutamyl-peptide cyclotransferase (glutamyl cyclase)	1,99135	640,88
212843_at	NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	8,53712	638,88
203987_at	FZD6	frizzled homolog 6 (Drosophila)	1,84997	638,79
244677_at	PER1	period homolog 1 (Drosophila)	2,70851	629,87
217732_s_at	ITM2B	integral membrane protein 2B	1,45146	609,23
209656_s_at	TMEM47	transmembrane protein 47	10,9758	607,78
228051_at	LOC202451	hypothetical protein LOC202451	2,74394	600,17
1569652_at	MLLT3	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3	3,34905	597,36
209541_at	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	2,05267	593,68
208306_x_at	HLA-DRB1	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	-3,1794	591,28
218966_at	MYO5C	myosin VC	2,30737	587,82
225846_at	RBM35A	hypothetical protein FLJ20171	2,95365	586,14
204646_at	DPYD	dihydropyrimidine dehydrogenase	2,21914	581,33
202729_s_at	LTBP1	latent transforming growth factor beta binding protein 1	1,92352	571,58
233463_at	RASSF6	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 6	10,834	560,74
218047_at	OSBPL9	oxysterol binding protein-like 9	-1,4641	555,76
204918_s_at	MLLT3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3	2,27758	555,74
212096_s_at	MTUS1	mitochondrial tumor suppressor 1	1,63864	552,00
217478_s_at	HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	-1,842	538,40
212698_s_at	SEPT10	septin 10	1,71119	532,73
208763_s_at	TSC22D3	TSC22 domain family, member 3	1,49614	530,85
201540_at	FHL1	four and a half LIM domains 1	3,12477	530,73
1569607_s_at	ANKRD20A1 /// ANKRD20A2 /// ANKRD20A3 /// ANKRD20A4 /// C21orf81 /// CCDC29	ankyrin repeat domain 20A /// chromosome 21 open reading frame 81 /// similar to ankyrin repeat domain 20A /// OTTHUMP00000015360 /// OTTHUMP00000064580	3,49732	524,75
229513_at	STRBP	Spermatid perinuclear RNA binding protein	2,2974	516,37
203404_at	ARMCX2	armadillo repeat containing, X-linked 2	1,81033	514,28
236995_x_at	TFEC	transcription factor EC	4	507,85
209447_at	SYNE1	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	1,50916	501,99
203836_s_at	MAP3K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1,97418	500,36
1558142_at	TNRC6B	trinucleotide repeat containing 6B	1,52891	500,03
206698_at	XK	Kell blood group precursor (McLeod phenotype)	1,77923	499,87
229872_s_at	LOC642441 /// LOC730256 /// LOC730257	LOC440667 /// LOC440669 /// LOC440688	2,1622	495,66
206545_at	CD28	CD28 antigen (Tp44)	3,29151	494,18
230748_at	SLC16A6	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6 /// similar to solute carrier family 16, member 6; monocarboxylate transporter 6	-1,8025	493,05

## Anhang

208658_at	PDIA4	protein disulfide isomerase family A, member 4	-1,5489	492,85
203060_s_at	PAPSS2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	2,08855	490,59
227034_at	ANKRD57	chromosome 2 open reading frame 26	2,23845	489,13
227792_at	LOC162073	CDNA: FLJ22994 fis, clone KAT11918	-2,0795	487,63
228153_at	RNF144B	IBR domain containing 2	5,98458	484,93
35974_at	LRMP	lymphoid-restricted membrane protein	1,54891	472,77
235308_at	ZBTB20	zinc finger and BTB domain containing 20	1,68909	471,89
214428_x_at	C4A /// C4B	complement component 4A /// complement component 4B /// complement component 4B, telomeric	3,16565	470,65
201425_at	ALDH2	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	1,63156	470,17
224724_at	SULF2	sulfatase 2	2,62761	468,61
1556097_at	HOMER2	homer homolog 2 (Drosophila)	3,4822	466,05
228724_at	TTLL7	Homo sapiens, clone IMAGE:5312516, mRNA	2,25793	458,61
203408_s_at	SATB1	special AT-rich sequence binding protein 1 (binds to nuclear matrix/scaffold-associating DNA's)	2,17159	455,02
214039_s_at	LAPTM4B	lysosomal associated protein transmembrane 4 beta	2,70851	447,93
219922_s_at	LTBP3	latent transforming growth factor beta binding protein 3	1,89868	444,64
201393_s_at	IGF2R	insulin-like growth factor 2 receptor	1,55563	444,28
206398_s_at	CD19	CD19 antigen	-11,866	443,01
232615_at	FLJ39739	Hypothetical FLJ39739 protein	3,00528	442,35
244841_at	SEC24A	SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)	-2,5937	441,21
221786_at	C6orf120	chromosome 6 open reading frame 120	-1,576	440,68
201029_s_at	CD99	CD99 antigen	-1,6818	439,33
1568609_s_at	FAM91A2 /// FLJ39739	KIAA0493 protein /// FLJ39739 protein	1,6529	436,68
220467_at	FLJ21272	hypothetical protein FLJ21272	2,25793	435,58
227871_at	CHM	hypothetical protein FLJ38564	-1,4452	433,46
217967_s_at	FAM129A	chromosome 1 open reading frame 24	1,67452	431,68
221648_s_at	AGMAT	agmatine ureohydrolase (agmatinase)	-3,3202	431,53
212737_at	GM2A	GM2 ganglioside activator	-1,7411	428,76
228956_at	UGT8	UDP glycosyltransferase 8 (UDP-galactose ceramide galactosyltransferase)	4,34317	427,10
202341_s_at	TRIM2	tripartite motif-containing 2	2,6968	426,75
221923_s_at	NPM1	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	-1,5897	426,59
229233_at	NRG3	neuregulin 3	5,30095	422,59
209696_at	FBP1	fructose-1,6-bisphosphatase 1	1,82608	422,48
215565_at	DTNB	dystrobrevin, beta	-2,5602	418,19
228221_at	SLC44A3	hypothetical protein MGC45474	2,89036	418,09
201204_s_at	RRBP1	Ribosome binding protein 1 homolog 180kDa (dog)	1,8823	416,84
238732_at	COL24A1	collagen, type XXIV, alpha 1	2,99229	408,70
229429_x_at	FAM91A2	LOC440669	1,77923	406,78
203820_s_at	IGF2BP3	IGF-II mRNA-binding protein 3	-2,473	406,73
225239_at	NEAT1	non-protein coding RNA 84	2,36813	404,75
213913_s_at	KIAA0984	KIAA0984 protein	2,14355	404,49
232098_at	DST	dystonin	2,77984	404,13
204674_at	LRMP	lymphoid-restricted membrane protein	1,5897	403,73
219882_at	TTLL7	tubulin tyrosine ligase-like family, member 7	2,00868	403,48
239835_at	KBTBD8	T-cell activation kelch repeat protein	1,3138	401,84
219368_at	NAP1L2	nucleosome assembly protein 1-like 2	2,31739	401,70
205992_s_at	IL15	interleukin 15	1,66728	400,66
228496_s_at	CRIM1	Cysteine-rich motor neuron 1	3,49732	400,50
229584_at	LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2	4,36203	400,06
234989_at	TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	2,25793	399,49
231969_at	STOX2	storkhead box 2	2	399,24
215313_x_at	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A	1,37197	397,60
201298_s_at	MOBK1B	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1B (yeast)	-1,4389	395,73



## Anhang

224901_at	SCD5	stearoyl-CoA desaturase 5	3,01833	395,32
203748_x_at	RBMS1	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	5,53564	394,32
213839_at	KIAA0500	KIAA0500 protein	2,39911	393,34
226344_at	ZMAT1	zinc finger, matrin type 1	1,82608	391,97
35626_at	SGSH	N-sulfoglucosamine sulfohydrolase (sulfamidase)	1,61748	388,58
1598_g_at	GAS6 /// LOC100133684	growth arrest-specific 6	1,54221	388,53
239893_at	MCTP2	Multiple C2-domains with two transmembrane regions 2	2,24817	387,04
210517_s_at	AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	2,5381	385,01
227121_at	---	MRNA; cDNA DKFZp586K1922 (from clone DKFZp586K1922)	1,6245	383,43
219572_at	CADPS2	Ca2+-dependent activator protein for secretion 2	1,94868	381,68
211990_at	HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	-2,0705	380,35
239331_at	---	Transcribed locus	2,32745	380,16
213510_x_at	LOC220594	TL132 protein	1,8025	378,73
202370_s_at	CBFB	core-binding factor, beta subunit	-1,3899	375,99
213566_at	RNASE6	ribonuclease, RNase A family, k6 /// ribonuclease, RNase A family, k6	-1,7336	375,41
230795_at	HIST1H4D	Histone 1, H4d	-1,6245	374,94
220330_s_at	SAMSN1	SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1	1,66728	374,70
235457_at	MAML2	mastermind-like 2 (Drosophila)	2,25793	374,29
228793_at	JMJD1C	jumonji domain containing 1C	1,74866	372,47
217962_at	NOLA3	nucleolar protein family A, member 3 (H/ACA small nucleolar RNPs)	-1,4142	372,16
224560_at	TIMP2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	2,13428	368,78
203216_s_at	MYO6	myosin VI	2,0174	366,57
210401_at	P2RX1	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	2,26773	365,16
231807_at	KIAA1217	KIAA1217	4,06992	363,79
226932_at	SSPN	sarcospan (Kras oncogene-associated gene)	-1,6964	363,37
202733_at	P4HA2	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide II	1,6529	363,24
232304_at	PELI1	Pellino homolog 1 (Drosophila)	3,39286	362,58
235427_at	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	1,6245	362,41
238067_at	TBC1D8B	FLJ20298 protein	2,54912	362,28
212334_at	GNS	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (Sanfilippo disease IIID)	-1,5355	361,84
235060_at	DKFZp547E087	PI-3-kinase-related kinase SMG-1-like	1,91521	361,74
1559156_at	PIAS1	Protein inhibitor of activated STAT, 1	2,03496	360,22
217738_at	PBEF1	pre-B-cell colony enhancing factor 1	1,78695	358,63
236646_at	C12orf59	hypothetical protein FLJ31166	3,40759	358,28
228603_at	ACTR3	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	1,53554	358,14
225681_at	CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1	1,56917	357,65
218311_at	MAP4K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3	1,50916	357,02
227383_at	LOC727820	Similar to KIAA0454 protein	2,65047	356,85
238559_at	---	CDNA clone IMAGE:5266242, partial cds	-1,4832	352,47
243176_at	ARL5A	ADP-ribosylation factor-like 5	-1,5223	352,13
241017_at	TBC1D8	TBC1 domain family, member 8 (with GRAM domain)	-1,7411	351,44
227646_at	EBF1	Early B-cell factor 1	-1,7639	351,23
207002_s_at	PLAGL1	pleiomorphic adenoma gene-like 1	1,82608	349,42
1556568_a_at	NLK	Nemo like kinase	3,17939	348,96
206674_at	FLT3	fms-related tyrosine kinase 3	1,8025	346,52
35776_at	ITSN1	intersectin 1 (SH3 domain protein)	1,73357	346,37
202973_x_at	FAM13A1	family with sequence similarity 13, member A1	2,11587	346,13
223243_s_at	EDEM3	chromosome 1 open reading frame 22	1,3484	345,47
215118_s_at	IGHA1	Hypothetical protein MGC27165	1,71862	344,52
209344_at	TPM4	Tropomyosin 4	1,56238	344,37
222589_at	NLK	nemo like kinase	1,37793	342,25
201552_at	LAMP1	lysosomal-associated membrane protein 1	1,36014	341,49
211517_s_at	IL5RA	interleukin 5 receptor, alpha	1,67452	340,55

## Anhang

212730_at	DMN	desmuslin	1,78695	340,05
1561167_at	ETV6	Ets variant gene 6 (TEL oncogene)	2,62761	339,19
212646_at	RFTN1	raft-linking protein	-2,5381	338,32
203680_at	PRKAR2B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	1,78695	335,91
202976_s_at	RHOBTB3	Rho-related BTB domain containing 3	2,3579	335,88
213156_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:4214654, mRNA	1,84997	335,80
219525_at	SLC47A1	hypothetical protein FLJ10847	1,89868	335,35
226225_at	MCC	mutated in colorectal cancers	2	334,36
200665_s_at	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) /// secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	2,05267	334,25
35820_at	GM2A	GM2 ganglioside activator	-1,6105	331,17
204944_at	PTPRG	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	3,52775	330,18
211991_s_at	HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	-1,9914	329,98
225344_at	NCOA7	nuclear receptor coactivator 7	1,71862	327,97
232213_at	PEL1	Pellino homolog 1 (Drosophila)	2,51621	326,95
244414_at	MAML2	Mastermind-like 2 (Drosophila)	4,08759	326,35
211799_x_at	HLA-C	Major histocompatibility complex, class I, C	1,66008	325,51
217824_at	UBE2J1	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1 (UBC6 homolog, yeast)	-1,5355	324,83
212807_s_at	SORT1	sortilin 1	1,68179	324,53
223358_s_at	PDE7A	Phosphodiesterase 7A	1,71119	324,02
217047_s_at	FAM13A1	family with sequence similarity 13, member A1	2,18102	322,89
214862_x_at	---	MRNA; cDNA DKFZp564G1162 (from clone DKFZp564G1162)	2,08855	322,75
225946_at	RASSF8	chromosome 12 open reading frame 2	3,34905	322,12
204058_at	ME1	Malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	2,86543	321,74
210299_s_at	FHL1	four and a half LIM domains 1	2,3477	321,43
201666_at	TIMP1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	1,5966	320,49
213792_s_at	INSR	insulin receptor	1,77154	320,30
244358_at	---	---	2,04379	319,74
1553928_at	ELMOD2	ELMO domain containing 2	-1,4204	319,67
209307_at	SWAP70	Switch-associated protein 70	-2,2776	319,02
209806_at	HIST1H2BK	histone 1, H2bk	-1,6529	319,01
242110_at	ARHGAP5	Rho GTPase activating protein 5	2,47298	318,60
209140_x_at	HLA-B /// MICA	major histocompatibility complex, class I, B	1,28565	318,12
205590_at	RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)	-2,4837	318,11
226321_at	LYSMD3	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 3	-1,2857	314,57
214450_at	CTSW	cathepsin W (lymphopain) /// cathepsin W (lymphopain)	4,14106	314,34
209540_at	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	1,60353	314,27
217731_s_at	ITM2B	integral membrane protein 2B	1,35426	313,66
209318_x_at	PLAGL1	pleiomorphic adenoma gene-like 1	2,5381	313,02
1554806_a_at	FBXO8	F-box protein 8	-1,4081	312,27
201724_s_at	GALNT1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1)	-1,6529	311,48
221875_x_at	HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	1,6245	311,35
200871_s_at	PSAP	prosaposin (variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy)	1,24725	311,00
231579_s_at	TIMP2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	1,84197	310,57
219263_at	RNF128	ring finger protein 128	6,14218	309,34
234032_at	ZCCHC7	zinc finger, CCHC domain containing 7	2,56019	308,68
1557961_s_at	LOC100127983	hypothetical protein LOC100127983	2,26773	305,76
214861_at	JMJD2C	jumonji domain containing 2C	1,97418	305,10
242121_at	RNF12	Ring finger protein 12	1,95714	304,59
209732_at	CLEC2B	C-type lectin domain family 2, member B	1,66008	303,33
213158_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:4214654, mRNA	1,56917	303,12
201661_s_at	ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	1,43271	300,81
222282_at	USP13	ubiquitin specific peptidase 13 (isopeptidase T-3)	1,84197	300,32

## Anhang

219743_at	HEY2	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	3,08442	300,20
225207_at	PKD4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	2,4945	298,61
221803_s_at	NRBF2	nuclear receptor binding factor 2	-1,4452	297,37
223354_x_at	C2orf33	chromosome 2 open reading frame 33	-1,5828	297,29
200602_at	APP	amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	2,25793	295,95
209735_at	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	2,15285	295,29
203560_at	GGH	gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygammaglutamyl hydrolase)	1,78695	294,98
237703_at	RPS10	Ribosomal protein S10	1,58282	294,69
228318_s_at	CRIPAK	hypothetical protein FLJ34443	1,54891	293,44
217820_s_at	ENAH	enabled homolog (Drosophila)	2,86543	293,39
220952_s_at	PLEKHA5	pleckstrin homology domain containing, family A member 5	4	293,24
224553_s_at	TNFRSF18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	1,858	292,79
238624_at	NLK	Nemo like kinase	1,60353	292,14
221728_x_at	XIST	X (inactive)-specific transcript	1,50916	291,77
235879_at	MBNL1	Muscleblind-like (Drosophila)	1,89868	291,71
222450_at	TMEPAI	transmembrane, prostate androgen induced RNA	2,04379	291,07
238117_at	PPOX	protoporphyrinogen oxidase	-1,9069	290,79
38269_at	PRKD2	protein kinase D2	1,21525	290,07
203616_at	POLB	polymerase (DNA directed), beta	-1,4961	290,04
218853_s_at	MOSPD1	motile sperm domain containing 1	-1,4768	288,56
239448_at	SMAD3	SMAD family member 3	5,51171	287,97
227384_s_at	LOC727820	Similar to KIAA0454 protein	2,2974	286,47
239862_at	TPD52	Tumor protein D52	2,10672	285,32
233251_at	STRBP	Spermatid perinuclear RNA binding protein	2,95365	285,24
226748_at	LYSMD2	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2	3,13834	285,23
243591_at	LAMC1	Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	2,26773	284,60
219563_at	C14orf139	chromosome 14 open reading frame 139	1,36604	284,18
205399_at	DCLK1	doublecortin and CaM kinase-like 1	2,47298	283,80
217825_s_at	UBE2J1	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1 (UBC6 homolog, yeast)	-1,4704	282,56
220099_s_at	LUC7L2	LUC7-like 2 (S. cerevisiae)	1,32524	282,34
201745_at	TWF1	PTK9 protein tyrosine kinase 9	-1,4961	282,27
226017_at	CMTM7	chemokine-like factor super family 7	-1,5289	282,27
232383_at	TFEC	transcription factor EC	7,27275	281,95
243016_at	TYMS	Thymidylate synthetase	1,76388	281,81
209109_s_at	TSPAN6	tetraspanin 6	3,08442	281,71
201368_at	ZFP36L2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	1,43271	280,89
201810_s_at	SH3BP5	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)	1,5897	278,71
213704_at	RABGGTB	Rab geranylgeranyltransferase, beta subunit	-1,5489	277,82
240383_at	UBE2D3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	1,95714	277,59
208796_s_at	CCNG1	cyclin G1	-1,4641	276,66
226388_at	TCEA3	transcription elongation factor A (SII), 3	2,82843	275,32
226301_at	C6orf192	chromosome 6 open reading frame 192	1,56917	274,47
223136_at	AIG1	androgen-induced 1	1,42035	274,21
201972_at	ATP6V1A	ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	-1,402	273,78
240118_at	TXNDC11	thioredoxin domain containing 11	-1,4832	273,30
201566_x_at	ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein /// inhibitor of DNA binding 2B, dominant negative helix-loop-helix protein	2,59368	272,47
227527_at	MLL2	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	1,45146	272,04
219313_at	GRAMD1C	hypothetical protein DKFZp434C0328	1,5966	271,76
218254_s_at	SAR1B	SAR1a gene homolog 2 (S. cerevisiae)	-1,4961	271,32
227395_at	TBCEL	tubulin folding cofactor E-like	2,37841	271,14
212775_at	OBSL1	KIAA0657 protein	2,31739	271,05
213900_at	C9orf61	chromosome 9 open reading frame 61	1,81819	270,74

## Anhang

214683_s_at	CLK1	CDC-like kinase 1	1,32524	269,43
243109_at	MCTP2	Multiple C2-domains with two transmembrane regions 2	2,06158	269,32
204774_at	EVI2A /// EVI2B	ecotropic viral integration site 2A	1,48968	269,14
221933_at	NLGN4X	neuroligin 4, X-linked	9,26955	268,69
201005_at	CD9	CD9 antigen (p24)	1,5897	268,21
218465_at	TMEM33	transmembrane protein 33	-1,402	266,96
203038_at	PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	2,5381	266,54
208812_x_at	HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C	1,15369	266,34
227062_at	TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA	1,63156	266,24
214290_s_at	HIST2H2AA3 /// HIST2H2AA4	histone 2, H2aa	-1,7336	265,17
228173_at	GNAS	GNAS complex locus	1,7411	265,08
225523_at	MRPL53	mitochondrial ribosomal protein L53	-1,3899	265,04
225904_at	C1orf96	chromosome 1 open reading frame 96	1,60353	264,93
206247_at	MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B	-1,4961	264,33
212196_at	IL6ST	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1,89048	263,85
202149_at	NEDD9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	-1,6529	263,80
212603_at	MRPS31	mitochondrial ribosomal protein S31	-1,3543	263,70
1564154_at	---	---	-1,5422	263,68
222245_s_at	FER1L4	fer-1-like 4 (C. elegans)	1,55563	262,37
211529_x_at	HLA-G	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G	1,51572	261,69
214156_at	MYRIP	myosin VIIA and Rab interacting protein	3,84704	261,10
210744_s_at	IL5RA	interleukin 5 receptor, alpha	1,68179	261,03
229437_at	BIC	BIC transcript	1,74866	260,34
236293_at	RHOH	Ras homolog gene family, member H	1,91521	260,20
1564164_at	DENND1B	hypothetical protein FLJ20054	1,74866	260,15
203773_x_at	BLVRA	biliverdin reductase A	-1,396	260,05
243759_at	SFRS15	Splicing factor, arginine/serine-rich 15	1,77154	259,63
202623_at	EAPP	chromosome 14 open reading frame 11	-1,3252	259,06
225626_at	PAG1	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1	-2,1529	258,88
211048_s_at	PDIA4	protein disulfide isomerase family A, member 4 /// protein disulfide isomerase family A, member 4	-1,3779	258,35
212195_at	IL6ST	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1,56917	258,03
213674_x_at	IGHD	immunoglobulin heavy constant delta	1,37197	257,83
218280_x_at	HIST2H2AA3 /// HIST2H2AA4	histone 2, H2aa	-1,5966	257,73
223797_at	PRO2852	hypothetical protein PRO2852	1,55563	257,62
224833_at	ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	-1,9487	257,12
235425_at	SGOL2	shugoshin-like 2 (S. pombe)	1,64576	256,71
214705_at	INADL	InaD-like (Drosophila)	2,38874	256,65
204917_s_at	MLLT3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3	1,47683	255,36
243020_at	FAM13A	Family with sequence similarity 13, member A	2,08855	255,15
1553959_a_at	B3GALT6	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase polypeptide 6	-1,4704	255,07
239092_at	ITGA8	integrin, alpha 8	1,94868	254,17
235167_at	DKFZp547E087	PI-3-kinase-related kinase SMG-1-like	1,83401	254,05
209695_at	LOC100131062 /// PTP4A3	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3	1,82608	253,46
238619_at	---	CDNA FLJ26188 fis, clone ADG04821	2,14355	252,90
204806_x_at	HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	1,63864	252,24
205383_s_at	ZBTB20	zinc finger and BTB domain containing 20	1,52891	251,45
223091_x_at	C2orf33	chromosome 2 open reading frame 33	-1,4515	250,32
1561079_at	ANKRD28	ankyrin repeat domain 28	2,19048	249,69
203725_at	GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	1,94868	248,93
201131_s_at	CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	1,87417	248,63
1557675_at	RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	1,66728	247,89

## Anhang

200027_at	NARS	asparaginyl-tRNA synthetase /// asparaginyl-tRNA synthetase	-1,3081	247,86
202975_s_at	RHOBTB3	Rho-related BTB domain containing 3	1,71119	247,43
224823_at	MYLK	myosin, light polypeptide kinase	4,26856	247,12
1565886_at	TRPM7	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7	1,84197	246,81
236558_at	MBNL1	Muscleblind-like (Drosophila)	5,01066	245,44
212104_s_at	RBM9	RNA binding motif protein 9	2,97935	245,10
201597_at	COX7A2	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver)	-1,2801	245,08
239393_at	PAN3	PABP1-dependent poly A-specific ribonuclease subunit PAN3	2,04379	245,01
212643_at	C14orf32	chromosome 14 open reading frame 32	-1,3426	244,44
214805_at	EIF4A1	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	1,44518	243,95
210968_s_at	RTN4	reticulon 4	1,3484	243,78
205651_x_at	RAPGEF4	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	1,50916	243,56
202768_at	FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	2,04379	243,25
221501_x_at	LOC339047	hypothetical protein LOC339047	1,38391	241,73
220035_at	NUP210	nucleoporin 210kDa	1,47044	241,64
204529_s_at	TOX	thymus high mobility group box protein TOX	-2,3074	241,47
1553185_at	RASEF	RAS and EF-hand domain containing	2,13428	241,36
205671_s_at	HLA-DOB	major histocompatibility complex, class II, DO beta	1,49614	240,94
208943_s_at	SEC62	translocation protein 1	-1,21	240,80
212426_s_at	YWHAQ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	-1,3779	240,69
1559170_at	MGC26718	Similar to ankyrin repeat domain 20A /// Hypothetical gene supported by NM_032250	1,98275	240,13
230229_at	DLG1	DKFZP586B0319 protein	1,72608	239,33
1557504_at	srp54	Signal recognition particle 54kDa	1,61049	238,40
229574_at	TRA2A	Transformer-2 alpha	1,67452	237,83
221768_at	SFPQ	Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	1,52891	237,73
203620_s_at	FCHSD2	FCH and double SH3 domains 2	-1,3779	237,33
236889_at	VPS37B	vacuolar protein sorting 37 homolog B (S. cerevisiae)	2,5381	237,12
209795_at	CD69	CD69 antigen (p60, early T-cell activation antigen)	3,11126	236,90
213275_x_at	CTSB	cathepsin B	1,71862	236,61
203988_s_at	FUT8	fucosyltransferase 8 (alpha (1,6) fucosyltransferase)	-1,6105	235,97
213975_s_at	LYZ	lysozyme (renal amyloidosis) /// leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1	2,30737	235,79
225390_s_at	KLF13	Kruppel-like factor 13	1,37793	235,68
235856_at	---	Transcribed locus	3,36359	235,64
222516_at	AP3M1	adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit	-1,396	235,50
228478_at	---	Full length insert cDNA YH99G08	2,28747	235,22
226178_at	SOCS4	suppressor of cytokine signaling 4	-1,4265	234,79
201543_s_at	SAR1A	SAR1a gene homolog 1 (S. cerevisiae)	-1,4327	234,72
210997_at	HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	3,79737	234,62
222449_at	TMEPAI	transmembrane, prostate androgen induced RNA	1,40201	234,35
241560_at	---	Transcribed locus	5,80582	233,72
239757_at	ZFAND6	Zinc finger, A20 domain containing 3	2,31739	233,45
200044_at	SFRS9	splicing factor, arginine/serine-rich 9 /// splicing factor, arginine/serine-rich 9	-1,4704	232,89
208869_s_at	GABARAPL1	GABA(A) receptor-associated protein like 1	1,63864	232,60
204563_at	SELL	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)	-1,7336	232,27
236766_at	C8orf38	chromosome 8 open reading frame 38	1,42652	232,04
228897_at	DERL3	Der1-like domain family, member 3	1,54891	232,00
206513_at	AIM2	absent in melanoma 2	-1,7715	231,98
205901_at	PNOC	prepronociceptin	-1,2636	231,95
239049_at	---	---	1,68179	231,75
221841_s_at	KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	5,0762	231,62
226770_at	MAGI3	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain	1,71119	231,61

## Anhang

		containing 3		
206302_s_at	NUDT4 /// NUDT4P1	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 /// nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4 pseudogene 1	-1,402	231,39
225060_at	LRP11	low density lipoprotein receptor-related protein 11	2,02616	231,27
224558_s_at	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non- coding RNA)	1,36604	230,33
243561_at	YAF2	YY1 associated factor 2	1,89048	230,16
205239_at	AREG /// AREGB	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	2,22877	229,42
224549_x_at	SND1	staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1	2,00868	229,04
212190_at	SERPINE2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	3,24901	228,98
225264_at	RARS2	arginyl-tRNA synthetase-like	-1,4641	228,88
222001_x_at	FAM91A2	LOC440669	1,56238	228,85
242268_at	CUGBP2	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	2,15285	228,34
219195_at	PPARGC1A	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1, alpha	2,31739	228,07
1553186_x_at	RASEF	RAS and EF-hand domain containing	1,73357	228,01
1555411_a_at	CCNL1	cyclin L1	1,58282	227,44
1569238_a_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:5259731, mRNA	3,23496	227,27
209960_at	HGF	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	5,34708	226,77
226250_at	---	CDNA FLJ34585 fis, clone KIDNE2008758	1,63156	226,27
200920_s_at	BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	1,51572	226,21
221868_at	PAIP2B	KIAA1155 protein	1,64576	225,94
210109_at	C7orf54	nasopharyngeal carcinoma associated gene protein-8	1,94026	225,90
209815_at	PTCH1	patched homolog (Drosophila)	1,3484	225,89
203139_at	DAPK1	death-associated protein kinase 1	1,93187	225,80
229483_at	UBE2H	Ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)	1,89048	225,58
202603_at	ADAM10	A disintegrin and metalloproteinase domain 10	-1,3839	224,23
213831_at	HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	-2,6505	224,19
221654_s_at	USP3	ubiquitin specific protease 3	-1,3252	223,95
1557987_at	LOC653786	Homo sapiens, clone IMAGE:5314747, mRNA	1,61748	223,74
204116_at	IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	1,67452	223,54
227364_at	CAPZA1	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1	-1,5489	223,01
241233_x_at	C21orf81	chromosome 21 open reading frame 81	2,19999	222,70
211458_s_at	GABARAPL1 /// GABARAPL3	GABA(A) receptor-associated protein like 1 /// GABA(A) receptors associated protein like 3	1,58282	222,33
209542_x_at	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	1,68909	222,01
232210_at	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	1,94026	221,90
212639_x_at	TUBA1B	tubulin, alpha, ubiquitous	1,32524	221,73
222830_at	GRHL1	grainyhead-like 1 (Drosophila)	1,57598	221,58
222496_s_at	FLJ20273	RNA-binding protein	-1,396	221,12
226085_at	CBX5	Chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, Drosophila)	1,56238	220,56
242521_at	---	CDNA clone IMAGE:30349460, partial cds	-1,7336	220,12
242068_at	BIRC6	Baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)	1,83401	219,99
1569346_a_at	P2RX1	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	2,1622	219,23
202972_s_at	FAM13A1	family with sequence similarity 13, member A1	1,82608	219,18
244033_at	C14orf145	chromosome 14 open reading frame 145	-1,85	218,35
214467_at	GPR65	G protein-coupled receptor 65	-2,7559	217,48
235927_at	XPO1	exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)	1,43271	217,48
202769_at	CCNG2	Cyclin G2	-1,6105	217,32
223087_at	ECHDC1	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 1	-1,576	217,26
202242_at	TSPAN7	tetraspanin 7	4,81905	217,10
242239_at	NSUN6	NOL1/NOP2/Sun domain family, member 6	1,45776	215,28
225541_at	RPL22L1	ribosomal protein L22-like 1	-1,366	215,22

## Anhang

215071_s_at	HIST1H2AC	histone 1, H2ac	-1,5092	215,18
43427_at	ACACB	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	1,81033	215,01
242814_at	SERPINB9	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	1,89868	214,88
225107_at	HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	1,42035	214,51
224567_x_at	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	1,31951	214,48
224621_at	MAPK1	LOC440806	1,50916	214,14
208944_at	TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	1,91521	214,09
210407_at	PPM1A	protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform	1,50916	214,02
218940_at	C14orf138	chromosome 14 open reading frame 138	-1,4704	213,97
225922_at	KIAA1450	KIAA1450 protein	1,73357	213,88
235346_at	FUNDC1	FUN14 domain containing 1	-1,4897	213,59
244625_at	RERE	Arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats	2,12505	213,58
1569477_at	FOXO3	Forkhead box O3A	1,8025	213,47
223276_at	MST150	putative small membrane protein NID67	2,0174	213,36
207057_at	SLC16A7	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 7	1,78695	213,24
214719_at	SLC46A3	hypothetical protein LOC283537	1,26905	213,12
206584_at	LY96	lymphocyte antigen 96	-1,3138	213,11
209737_at	MAGI2	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2	1,97418	212,50
207845_s_at	ANAPC10	anaphase promoting complex subunit 10	-1,2968	212,05
212588_at	PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	-1,6745	211,69
226335_at	RPS6KA3	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3	-1,6316	211,40
224606_at	KLF6	Homo sapiens, clone IMAGE:4096273, mRNA	1,76388	211,22
1557505_a_at	SRP54	Signal recognition particle 54kDa	1,5223	211,12
213646_x_at	TUBA1B	tubulin, alpha, ubiquitous	1,29123	210,90
244659_at	TRIP12	Thyroid hormone receptor interactor 12	1,7411	210,28
210282_at	ZMYM2	zinc finger protein 198	1,61748	210,13
219137_s_at	C2orf33	chromosome 2 open reading frame 33	-1,4389	209,64
230003_at	---	Transcribed locus	1,43271	209,51
221526_x_at	PARD3	par-3 partitioning defective 3 homolog (C. elegans)	3,42238	209,42
209539_at	ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	-1,4961	209,35
228617_at	XAF1	XIAP associated factor-1	1,50264	208,84
237006_at	AFF1	AF4/FMR2 family, member 1	1,90693	208,82
232889_at	GUSBP1	hypothetical protein LOC153561	2,07952	208,17
233690_at	C21orf96	chromosome 21 open reading frame 96	2,54912	208,12
243296_at	PBEF1	Pre-B-cell colony enhancing factor 1	2,80403	208,06
212779_at	KIAA1109	KIAA1109	1,35426	207,68
223139_s_at	DHX36	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36	1,3138	207,44
203096_s_at	RAPGEF2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	1,66008	207,18
205033_s_at	DEFA1 /// DEFA3 /// LOC728358	defensin, alpha 1, myeloid-related sequence /// defensin, alpha 3, neutrophil-specific	2,94088	206,86
211640_x_at	IGHA1 /// IGHG1 /// LOC100133862	IgM rheumatoid factor RF-TT1, variable heavy chain /// IgM rheumatoid factor RF-TT1, variable heavy chain	1,43893	206,48
209682_at	CBLB	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	1,45146	206,45
225585_at	RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family	-1,5624	206,25
239930_at	GALNT2	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2)	1,63156	206,07
242405_at	MAML2	Mastermind-like 2 (Drosophila)	4,86099	205,82
236404_at	ATXN1	ataxin 1	2,22877	205,76
244674_at	RBM6	RNA binding motif protein 6	1,71862	205,36
237062_at	RNF10	Ring finger protein 10	1,43271	204,93
238642_at	ANKRD13D	ankyrin repeat domain 13 family, member D	1,5897	204,78

## Anhang

224252_s_at	FXYD5	FXYD domain containing ion transport regulator 5	1,46409	204,74
203923_s_at	CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)	1,98275	204,66
237594_at	MSI2	musashi homolog 2 (Drosophila)	1,858	204,50
243286_at	CUL1	Cullin 1	1,98275	204,42
203837_at	MAP3K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1,81819	203,99
208683_at	CAPN2	calpain 2, (m/II) large subunit	1,24186	203,26
219371_s_at	KLF2	Kruppel-like factor 2 (lung)	1,39595	203,15
222365_at	TBCEL	tubulin folding cofactor E-like	2,56019	203,06
208891_at	DUSP6	dual specificity phosphatase 6	2,19999	202,84
239232_at	MSI2	Musashi homolog 2 (Drosophila)	1,82608	202,69
225232_at	MTMR12	myotubularin related protein 12	-1,372	202,64
240498_at	ETV6	Ets variant gene 6 (TEL oncogene)	2,1622	202,33
228360_at	LOC130576	hypothetical protein LOC130576	1,84997	202,13
235666_at	ITGA8	Transcribed locus, weakly similar to XP_496299.1 PREDICTED: hypothetical protein LOC148206 [Homo sapiens]	1,27456	202,04
225073_at	PPHLN1	periphilin 1	-1,3601	202,02
203324_s_at	CAV2	caveolin 2	1,56238	201,95
214030_at	DKFZp667G2110	hypothetical protein DKFZp667G2110	1,60353	201,80
224405_at	FCRL5	Fc receptor-like 5 /// Fc receptor-like 5	-1,5092	201,19
236310_at	ZNF37B	Zinc finger protein 37b (KOX 21)	1,54891	200,94
222378_at	FLJ43663	Hypothetical protein FLJ43663	2,68515	199,85
218194_at	REXO2	small fragment nuclease	-1,4832	199,40
241681_at	MBNL2	Muscleblind-like (Drosophila)	1,63864	199,39
1566491_at	RGD1560831	Similar to 40S ribosomal protein S3	1,57598	198,87
218084_x_at	FXYD5	FXYD domain containing ion transport regulator 5	1,50264	198,78
225724_at	FLJ31306	hypothetical protein FLJ31306	1,37793	198,56
225343_at	TMED8	transmembrane emp24 domain containing 8	-1,4452	198,33
200041_s_at	BAT1	HLA-B associated transcript 1 /// HLA-B associated transcript 1	1,47683	197,99
231997_at	TBCEL	leucine rich repeat containing 35	2,26773	197,98
208078_s_at	SNF1LK	SNF1-like kinase /// SNF1-like kinase	1,25266	197,91
227949_at	PHACTR3	phosphatase and actin regulator 3	3,96549	197,77
204526_s_at	TBC1D8	TBC1 domain family, member 8 (with GRAM domain)	2,10672	196,98
237216_at	RALGAPA1	GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 1	2,25793	196,95
222316_at	USO1	USO1 homolog, vesicle docking protein (yeast)	1,66008	196,92
227624_at	KIAA1546	KIAA1546 protein	1,61049	196,80
218870_at	ARHGAP15	Rho GTPase activating protein 15	-1,6745	196,77
242320_at	FOXO3	Forkhead box O3A	1,81819	196,42
242008_at	AGTPBP1	ATP/GTP binding protein 1	1,94026	196,38
218968_s_at	ZFP64	zinc finger protein 64 homolog (mouse)	-1,4641	195,60
207076_s_at	ASS1	argininosuccinate synthetase	1,77923	195,21
230609_at	CLINT1	enthoprotin	2,07053	194,73
1553703_at	ZNF791	hypothetical protein FLJ90396	1,29123	194,64
232628_at	FAM13A	Family with sequence similarity 13, member A1	2,63902	194,51
214722_at	NOTCH2NL	Notch homolog 2 (Drosophila) N-terminal like	1,5223	194,02
241722_x_at	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	1,54221	193,67
239901_at	FLJ43663	Hypothetical protein FLJ43663	2,45164	193,36
227082_at	---	MRNA; cDNA DKFZp586K1922 (from clone DKFZp586K1922)	1,56917	193,18
224929_at	TMEM173	hypothetical protein LOC340061	1,8025	193,02
232174_at	EXT1	Exostoses (multiple) 1	1,93187	192,81
212364_at	MYO1B	myosin IB	3,03143	192,50
222024_s_at	AKAP13	A kinase (PRKA) anchor protein 13	1,45776	192,20
200953_s_at	CCND2	cyclin D2	-2,2	191,88
206205_at	MPHOSPH9	M-phase phosphoprotein 9	-1,5692	191,76
225394_s_at	ZCRB1	MADP-1 protein	-1,2801	191,68



## Anhang

211998_at	H3F3B	H3 histone, family 3B (H3.3B)	1,49614	191,55
210145_at	PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	3,16565	191,12
208623_s_at	EZR	villin 2 (ezrin)	1,30247	191,04
223940_x_at	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	1,5966	191,04
223370_at	PLEKHA3	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 3	-1,3368	190,98
213939_s_at	RUFY3	rap2 interacting protein x	2,00868	190,96
208158_s_at	OSBPL1A	oxysterol binding protein-like 1A /// oxysterol binding protein-like 1A	1,95714	190,95
217371_s_at	IL15	interleukin 15	1,93187	190,92
218011_at	UBL5	ubiquitin-like 5	-1,3138	190,77
235432_at	NPHP3	nephronophthisis 3 (adolescent)	1,54891	190,56
226546_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:5268696, mRNA	-1,5355	190,45
201531_at	ZFP36	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	1,47044	190,35
227354_at	PAG1	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1	-1,7411	189,77
230659_at	EDEM1	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1	-1,4961	189,73
223263_s_at	FGFR1OP2	FGFR1 oncogene partner 2	1,38391	189,65
222891_s_at	BCL11A	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	1,45146	189,44
201009_s_at	TXNIP	thioredoxin interacting protein	1,20476	189,09
218357_s_at	TIMM8B	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog B (yeast)	-1,3252	188,58
214693_x_at	KIAA1245 /// LOC728980 /// LOC730476 /// NBPF1 /// NBPF10 /// NBPF11 /// NBPF14 /// NBPF15 /// NBPF16 /// NBPF20 /// NBPF8 /// NBPF9	hypothetical protein DJ328E19.C1.1 /// hypothetical protein FLJ20719 /// hypothetical protein LOC200030 /// hypothetical protein MGC8902 /// similar to KIAA1693 protein /// AE01 mRNA /// AG1 protein /// hypothetical LOC440675	1,71119	188,51
229070_at	C6orf105	chromosome 6 open reading frame 105	1,5223	188,47
239544_at	SETBP1	SET binding protein 1	1,89048	188,37
230777_s_at	LOC728766 /// PRDM15	PR domain containing 15	1,55563	188,27
212998_x_at	HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1 /// major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	-5,5356	188,15
1555832_s_at	KLF6	Homo sapiens, clone IMAGE:4096273, mRNA	1,78695	188,08
230688_at	MBNL2	Muscleblind-like 2 (Drosophila)	1,57598	188,06
1565701_at	---	MRNA; cDNA DKFZp451B0818 (from clone DKFZp451B0818)	1,48968	188,02
218005_at	ZNF22	zinc finger protein 22 (KOX 15)	-1,2857	187,97
214141_x_at	SFRS7	splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa	1,30812	187,85
1569180_at	LRRC37A2	C114 SLIT-like testicular protein	1,84197	187,80
210889_s_at	FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	-1,4641	187,73
223798_at	SLC41A2	solute carrier family 41, member 2	-1,4327	186,92
200904_at	HLA-E	Major histocompatibility complex, class I, E	1,44518	186,79
208961_s_at	KLF6	Kruppel-like factor 6	2,27758	186,44
204951_at	RHOH	ras homolog gene family, member H	1,27456	186,41
223512_at	SAR1B	SAR1a gene homolog 2 (S. cerevisiae)	-1,6245	186,35
226474_at	NLRC5	nucleotide-binding oligomerization domains 27	1,67452	186,35
242572_at	GAB1	GRB2-associated binding protein 1	1,83401	186,22
227671_at	XIST	X (inactive)-specific transcript	1,31951	186,00
216945_x_at	PASK	PAS domain containing serine/threonine kinase	-3,0053	185,22
213649_at	SFRS7	splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa	1,47683	185,14
217739_s_at	PBEF1	pre-B-cell colony enhancing factor 1	1,48968	185,13
242233_at	RALGAPB	KIAA1219 protein	1,44518	184,99

## Anhang

212311_at	KIAA0746	KIAA0746 protein	-1,2968	184,98
201096_s_at	ARF4	ADP-ribosylation factor 4	-1,2258	184,63
236125_at	DKFZP586I1420	Hypothetical protein DKFZp586I1420	1,54891	183,97
220169_at	TMEM156	hypothetical protein FLJ23235	-1,6891	183,97
202887_s_at	DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	1,57598	183,87
214265_at	ITGA8	integrin, alpha 8	1,6529	183,70
239851_at	TMED10	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)	1,52891	182,78
1555827_at	CCNL1	Cyclin L1	1,8025	182,43
218905_at	INTS8	hypothetical protein FLJ20530	-1,2527	182,42
233674_at	FOXO3	Forkhead box O3A	1,90693	182,40
242362_at	CUL3	Cullin 3	1,84997	182,18
234033_at	---	Clone IMAGE:110218 mRNA sequence	3,29151	182,07
204170_s_at	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	-1,85	182,05
215768_at	SOX5	SRY (sex determining region Y)-box 5	1,77923	182,00
220046_s_at	CCNL1	cyclin L1	1,45146	181,77
235094_at	TPM4	Tropomyosin 4	1,68909	181,52
201947_s_at	CCT2	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	-1,2801	180,33
1557240_a_at	BBX	Bobby sox homolog (Drosophila)	1,67452	180,26
228623_at	---	Transcribed locus, weakly similar to XP_517454.1 PREDICTED: similar to hypothetical protein MGC45438 [Pan troglodytes]	2,11587	180,15
203196_at	ABCC4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	-1,8025	179,75
239654_at	CHD9	Chromodomain helicase DNA binding protein 9	1,44518	179,35
213605_s_at	LOC728411	Hypothetical protein MGC22265 /// Similar to bA110H4.2 (similar to membrane protein)	1,67452	178,58
221970_s_at	NOL11	DKFZP586L0724 protein	-1,3543	178,51
236075_s_at	USP6	ubiquitin specific peptidase 6 (Tre-2 oncogene)	-1,4578	178,47
214414_x_at	HBA2	hemoglobin, alpha 2 /// hemoglobin, alpha 2	2,25793	178,43
1557285_at	AREGB	Amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	2,28747	178,25
226252_at	---	CDNA FLJ34585 fis, clone KIDNE2008758	1,45146	177,90
212287_at	SUZ12	suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila)	-1,2636	177,81
214629_x_at	RTN4	reticulon 4	1,17895	177,38
202259_s_at	N4BP2L2	phosphonoformate immuno-associated protein 5	1,31951	177,07
208095_s_at	SRP72	signal recognition particle 72kDa	-1,3426	177,05
228531_at	SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	-1,5624	176,98
227510_x_at	PRO1073	PRO1073 protein	1,63156	176,84
203167_at	TIMP2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	1,50264	176,72
235482_at	LOC400960	hypothetical gene supported by BC040598	1,3138	176,61
230493_at	TMEM46	transmembrane protein 46	2,77984	176,08
212623_at	TMEM41B	transmembrane protein 41B	-1,3601	175,99
201842_s_at	EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	3,19319	175,58
1558438_a_at	IGHV3-74	Isolate A8 AF1 non-allergic IgE heavy chain IGHV3-74	-1,9319	175,17
227122_at	ZNF791	zinc finger protein 791	1,35426	175,08
209480_at	HLA-DQB1	Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1 /// Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	-6,2225	174,74
232489_at	CCDC76	hypothetical protein FLJ10287	1,61748	174,19
239597_at	PAN3	PABP1-dependent poly A-specific ribonuclease subunit PAN3	1,81819	174,02
228486_at	SLC44A1	CDW92 antigen	1,19437	173,87
203543_s_at	KLF9	Kruppel-like factor 9	1,56238	173,63
213571_s_at	EIF4E2	eukaryotic translation initiation factor 4E member 2	-1,366	173,47
217164_at	SLCO4A1	solute carrier organic anion transporter family, member 4A1	1,48968	173,46
201466_s_at	JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	1,38391	172,90
221989_at	RPL10	ribosomal protein L10	1,36014	172,80
225507_at	SFRS18	chromosome 6 open reading frame 111	1,3138	172,64
228702_at	FLJ43663	hypothetical protein FLJ43663	1,4081	172,27
207980_s_at	CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	1,32524	172,26

## Anhang

217855_x_at	SDF4	stromal cell derived factor 4	1,23649	172,10
211276_at	TCEAL2	transcription elongation factor A (SII)-like 2	3,36359	172,04
218252_at	CKAP2	cytoskeleton associated protein 2	-1,6386	171,91
242476_at	---	Transcribed locus, moderately similar to NP_872301.1 hypothetical protein FLJ25224 [Homo sapiens]	1,56238	171,62
205990_s_at	WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	1,70379	171,13
206028_s_at	MERTK	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	1,47044	170,84
230180_at	DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	1,77154	170,59
214870_x_at	LOC339047 /// LOC642799 /// NPIP	nuclear pore complex interacting protein /// hypothetical protein LOC339047 /// similar to hypothetical protein LOC339047	1,36014	170,56
215992_s_at	RAPGEF2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	1,97418	170,50
49452_at	ACACB	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	1,54891	170,40
243768_at	SENPA	SUMO1/sentrin specific peptidase 6	1,7411	170,35
243039_at	---	---	1,5966	170,31
225177_at	RAB11FIP1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)	1,73357	170,18
226617_at	ARL5A	ADP-ribosylation factor-like 5	-1,3081	170,14
241891_at	DOCK8	Dedicator of cytokinesis 8	1,53554	170,12
215621_s_at	IGHD	immunoglobulin heavy constant delta	1,50264	170,04
1560622_at	TMEM165	transmembrane protein 165	1,60353	169,85
220940_at	KIAA1641	KIAA1641	1,48324	169,51
200989_at	HIF1A	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	-1,4327	169,48
236379_at	EPB41	Erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked)	1,45776	168,89
1556277_a_at	PAPD4	PAP associated domain containing 4	1,61049	168,85
222326_at	PDE4B	Phosphodiesterase 4B, cAMP-specific (phosphodiesterase E4 dunce homolog, Drosophila)	1,61049	168,79
208726_s_at	EIF2S2	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 beta, 38kDa	-1,3081	168,39
209723_at	SERPINA9	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	1,56238	168,23
1569181_x_at	LRRC37A2	C114 SLIT-like testicular protein	1,47044	167,99
230599_at	RNF19A	Ring finger protein 19	1,54221	167,91
211072_x_at	TUBA1B	tubulin, alpha, ubiquitous /// tubulin, alpha, ubiquitous	1,25266	167,91
1556183_at	FLJ40330	Homo sapiens, clone IMAGE:5167446, mRNA	1,33677	167,86
232032_x_at	SDF4	stromal cell derived factor 4	1,25266	167,26
240601_at	RPA3	replication protein A3, 14kDa	1,56917	167,23
201070_x_at	SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	1,37793	167,22
215191_at	KDM2A	lysine (K)-specific demethylase 2A	1,46409	167,02
243810_at	---	Transcribed locus	1,58282	166,31
208892_s_at	DUSP6	dual specificity phosphatase 6	2,26773	166,31
243046_at	UBE2D3P	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 pseudogene	1,45146	166,27
226851_at	LYPLAL1	lysophospholipase-like 1	1,4081	165,74
240159_at	SLC15A2	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	1,79471	165,56
38241_at	BTN3A3	butyrophilin, subfamily 3, member A3	1,21525	165,44
228222_at	PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform; speedy homolog A (Xenopus laevis)	-1,4515	165,29
201090_x_at	TUBA1B	tubulin, alpha, ubiquitous	1,29123	164,71
205114_s_at	CCL3 /// CCL3L1 /// CCL3L3 /// LOC728830	chemokine (C-C motif) ligand 3 /// chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1 /// chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	1,81819	164,32
202379_s_at	NKTR	natural killer-tumor recognition sequence	1,42652	163,64
243857_at	MORF4L2	Mortality factor 4 like 2	1,68179	162,80
215786_at	rsf1	remodeling and spacing factor 1	1,34257	162,72
210479_s_at	RORA	RAR-related orphan receptor A	1,47044	161,89
232978_at	MBNL2	Muscleblind-like 2 (Drosophila)	1,44518	161,73
203006_at	INPP5A	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 40kDa	1,43271	161,03
232138_at	MBNL2	Muscleblind-like 2 (Drosophila)	1,5966	160,97

## Anhang

232354_at	VPS37B	vacuolar protein sorting 37 homolog B (S. cerevisiae)	2,24817	160,83
225105_at	OCC-1	hypothetical protein	-2,1436	160,82
222805_at	MANEA	mannosidase, endo-alpha	-1,2746	160,43
227388_at	TUSC1	tumor suppressor candidate 1	1,81819	160,42
241843_at	SNORA28	Eukaryotic translation initiation factor 5	1,48324	160,25
200866_s_at	PSAP	prosaposin (variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy)	1,37197	160,13
214257_s_at	SEC22B	SEC22 vesicle trafficking protein-like 1 (S. cerevisiae)	-1,4204	159,98
1558111_at	MBNL1	Muscleblind-like (Drosophila)	1,46409	159,55
214305_s_at	SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	1,38391	159,37
224568_x_at	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	1,6529	158,60
201839_s_at	TACSTD1	tumor-associated calcium signal transducer 1	1,90693	158,59
228658_at	MIAT	hypothetical protein LOC150271	1,49614	158,58
210172_at	SF1	splicing factor 1	1,72608	158,50
243606_at	FAM55C	family with sequence similarity 55, member C	-1,2801	158,10
207543_s_at	P4HA1	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide I	-1,3252	157,77
203231_s_at	ATXN1	ataxin 1	1,61748	157,59
234983_at	c12orf49	chromosome 12 open reading frame 49	-1,4832	157,37
227414_at	RHBDD1	hypothetical protein DKFZp547E052	-1,366	157,11
244546_at	CYCS	cytochrome c, somatic	1,70379	156,72
222313_at	CNOT2	CCR4-NOT transcription complex, subunit 2	2,70851	156,54
241917_at	FCHSD2	FCH and double SH3 domains 2	1,5223	156,39
203110_at	PTK2B	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	1,6245	156,27
218486_at	KLF11	Kruppel-like factor 11	1,47044	156,03
208691_at	TFRC	transferrin receptor (p90, CD71) /// transferrin receptor (p90, CD71)	-1,3543	155,73
209583_s_at	CD200	CD200 antigen	1,61748	155,70
236244_at	HNRPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)	1,89868	155,58
239629_at	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	1,60353	155,00
227802_at	RUFY3	RUN and FYVE domain containing 3	1,38391	154,80
228105_at	SAPS3	SAPS domain family, member 3	1,858	154,76
213446_s_at	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	1,4081	154,33
240094_at	TMX4	thioredoxin-related transmembrane protein 4	2,04379	153,08
206574_s_at	LOC100131062 /// PTP4A3	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3	1,5223	152,93
201700_at	CCND3	cyclin D3	1,72608	152,83
208707_at	EIF5	eukaryotic translation initiation factor 5	1,57598	152,78
242074_at	PITPNB	Phosphatidylinositol transfer protein, beta	1,5897	152,73
243465_at	TMEM140	transmembrane protein 140	1,33677	151,51
225481_at	FRMD6	FERM domain containing 6	1,89868	151,51
201698_s_at	SFRS9	splicing factor, arginine/serine-rich 9	-1,2857	151,49
201085_s_at	SON	SON DNA binding protein	1,48324	151,45
226217_at	SLC30A7	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 7	-1,2048	151,38
204863_s_at	IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1,48968	151,37
243395_at	CD55	Decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	1,58282	151,35
235374_at	MDH1	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	1,37793	150,92
212276_at	LPIN1	lipin 1	1,40201	150,76
222667_s_at	ASH1L	ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)	1,18921	150,67
213135_at	TIAM1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	1,60353	150,58
218346_s_at	SESN1	sestrin 1	1,57598	149,84
233969_at	IGL@	Anti-dsDNA Ig lambda light chain variable region /// Immunoglobulin lambda variable 3-21	1,74866	149,59
223640_at	HCST	hematopoietic cell signal transducer	-2,1436	149,53
228592_at	MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	2,44105	149,38

## Anhang

216321_s_at	NR3C1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	-1,2473	149,34
224590_at	XIST	X (inactive)-specific transcript	1,17385	149,22
212902_at	SEC24A	SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)	-1,396	149,17
226190_at	MAP3K13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	-1,4452	148,98
229413_s_at	PCGF3	polycomb group ring finger 3	1,52891	148,86
202759_s_at	AKAP2 /// PALM2 /// PALM2-AKAP2	PALM2-AKAP2 protein	-1,1996	148,56
235716_at	TRA2A	Transformer-2 alpha	1,5966	148,12
210281_s_at	ZMYM2	zinc finger protein 198	1,31951	147,87
205933_at	SETBP1	SET binding protein 1	1,25266	147,84
1554149_at	CLDND1	chromosome 3 open reading frame 4	-1,3779	147,64
207522_s_at	ATP2A3	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous	1,5897	147,47
238988_at	TOP1	Topoisomerase (DNA) I	1,5897	147,42
201844_s_at	RYBP	RING1 and YY1 binding protein	-1,3899	147,27
212515_s_at	DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	1,40201	146,84
229835_s_at	SLMO2	Chromosome 20 open reading frame 45	-1,5624	146,70
201079_at	SYNGR2	synaptogyrin 2	1,56238	145,92
218654_s_at	MRPS33	mitochondrial ribosomal protein S33	-1,396	145,84
239050_s_at	---	CDNA FLJ13202 fis, clone NT2RP3004503	1,23649	145,48
228245_s_at	LOC728715 /// OVOS2	ovostatin 2	1,99135	145,07
200704_at	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor	1,18921	144,79
204881_s_at	UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	1,33099	144,59
205859_at	LY86	lymphocyte antigen 86	1,48324	143,47
210176_at	TLR1	toll-like receptor 1	-1,5157	143,39
243981_at	STK4	serine/threonine kinase 4	1,81033	143,27
213998_s_at	DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	1,63156	143,18
235902_at	---	Similar to hect domain and RLD 2	1,42035	143,07
214035_x_at	LOC399491	LOC399491 protein	1,31951	142,73
219833_s_at	EFHC1	EF-hand domain (C-terminal) containing 1	-1,4452	142,33
202708_s_at	HIST2H2BE	histone 2, H2be	-1,4832	142,31
209457_at	DUSP5	dual specificity phosphatase 5	1,42035	142,16
204208_at	RNGTT	RNA guanylyltransferase and 5'-phosphatase	-1,4204	142,01
1564069_at	---	CDNA FLJ36668 fis, clone UTERU2003926	-1,6386	141,70
241775_at	SCFD1	Sec1 family domain containing 1	1,47683	141,69
232369_at	MBNL2	Muscleblind-like 2 (Drosophila)	1,40201	141,46
1555372_at	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	1,37197	141,45
201195_s_at	SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	1,28565	141,36
230779_at	TNRC6B	trinucleotide repeat containing 6B	1,27456	141,25
209398_at	HIST1H1C	histone 1, H1c	-1,4515	141,12
202656_s_at	SERTAD2	SERTA domain containing 2	1,26357	140,88
244026_at	ELL2	Elongation factor, RNA polymerase II, 2	1,25266	140,85
237849_at	MAN1A1	Mannosidase, alpha, class 1A, member 1	1,38992	140,82
215001_s_at	GLUL	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	1,39595	140,65
225866_at	BXDC1	brix domain containing 1	-1,3025	140,63
212183_at	NUDT4	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	-1,5092	140,44
204066_s_at	CENTG2	centaurin, gamma 2	5,09824	140,36
203729_at	EMP3	epithelial membrane protein 3	1,4081	139,95
237561_x_at	TPM4	Tropomyosin 4	1,32524	139,68
235146_at	tmcc3	Transmembrane and coiled-coil domains 3	1,46409	139,53
228487_s_at	RREB1	Ras responsive element binding protein 1	-1,4204	139,50
243683_at	MORF4L2	Mortality factor 4 like 2	1,47044	139,45
233079_at	MERTK	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	1,84997	139,26
242859_at	TFCP2	Transcription factor CP2	2,72027	138,76

## Anhang

212912_at	RPS6KA2	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2	1,8823	138,70
225673_at	MYADM	myeloid-associated differentiation marker	1,16372	138,51
242563_at	FCHSD2	FCH and double SH3 domains 2	1,68179	138,46
238774_at	KIAA1267	KIAA1267	1,67452	138,36
1555938_x_at	VIM	vimentin	1,36604	138,25
225786_at	LOC284702	Family with sequence similarity 36, member A	1,37197	138,18
200962_at	RPL31	ribosomal protein L31	-1,5422	138,18
219959_at	MOCOS	molybdenum cofactor sulfurase	2,08855	138,17
220068_at	VPREB3	pre-B lymphocyte gene 3	-1,4832	138,09
239571_at	MEF2A	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide A (myocyte enhancer factor 2A)	1,32524	137,93
239108_at	MLSTD1	Male sterility domain containing 1	1,79471	137,70
227227_at	LRRC37A	leucine rich repeat containing 37A	1,31951	137,67
206207_at	CLC	Charcot-Leyden crystal protein /// Charcot-Leyden crystal protein	2,5713	137,45
210426_x_at	RORA	RAR-related orphan receptor A	1,36604	137,41
1558002_at	STRAP	Serine/threonine kinase receptor associated protein	1,56917	137,03
229067_at	SRGAP2P1	Similar to Formin binding protein 2 (srGAP2)	-1,5422	136,96
201465_s_at	JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	1,68179	136,39
213931_at	ID2 /// ID2B	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein /// inhibitor of DNA binding 2B, dominant negative helix-loop-helix protein	1,82608	136,19
236907_at	PABPC1	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	1,42035	135,90
242280_x_at	CPEB4	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4	1,36604	135,44
215330_at	FLJ43663	Hypothetical protein FLJ43663	1,96564	134,86
209474_s_at	ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	-1,5897	133,14
224685_at	MLLT4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 4	1,56238	130,13
243233_at	PAN3	PABP1-dependent poly A-specific ribonuclease subunit PAN3	1,51572	128,56
224435_at	C10orf58	chromosome 10 open reading frame 58 /// chromosome 10 open reading frame 58	1,64576	120,20
222774_s_at	NETO2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	-1,8742	117,42
215307_at	ZNF529	zinc finger protein 529	-2,6505	115,18
223374_s_at	B3GALNT1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 3	2,0174	112,72
218918_at	MAN1C1	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	4,10534	104,43
227394_at	NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1	2,00868	102,17
242100_at	CHSY-2	chondroitin sulfate synthase 3	9,07093	89,02
214119_s_at	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa	-1,7715	88,74

## Expression von Genen bestimmter funktioneller Gruppen

Während die unter 3.1.3.2 beschriebene Identifikation funktioneller Gruppen mittels DAVID Bioinformatics Resources sich nur auf die signifikant differenziell exprimierten Gene in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ beschränkt, stellte sich auch die Frage nach der qualitativen An- bzw. Abwesenheit bestimmter Transkripte in diesen beiden PZ-Populationen, unabhängig davon, ob das entsprechende Gen unterschiedlich exprimiert wird oder nicht. Eine umfassende Analyse des Transkriptoms reifer PZ im KM gesunder Probanden könnte somit einen tieferen Einblick in Biologie und zelluläre Prozesse von KMPZ liefern. Die folgenden Kapitel bieten einen Überblick über An- bzw. Abwesenheit bestimmter Gene sowie deren Expressionsstärke in CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, zusammengefasst in Gruppen, die entweder aufgrund ihrer für PZ oder Immunzellen allgemein relevanten Funktion oder basierend auf den Ergebnissen des *Functional Annotation Clustering* (3.1.3.2) ausgewählt wurden. Die Gengruppen wurden hierbei anhand von Primärliteratur zusammengestellt. Falls für ein Gen mehrere Sonden gemessen wurden, wurden für die folgenden Abbildungen jeweils jene Affymetrix-IDs mit der höchsten Signalstärke oder dem größten *fold change* (FC) zwischen CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ ausgewählt.

### Referenzen für Gengruppen:

#### **B- und Plasmazellmarker und Qualitätskontrolle:**

Anderson et al., 1996; Cooper et al., 2001; Fairfax et al., 2008; Fink und Bevan, 1995; Kruisbeek, 1999; Mei et al., 2007; Murphy, 2011; Shapiro-Shelef und Calame, 2005; Simmons et al., 1989; Wang und Yan, 2013

#### **Interleukine, Chemokine und Zytokine:**

Borish und Steinke, 2003; Commins et al., 2010; Steinke und Borish, 2006

#### **Apoptose:**

Budihardjo et al., 1999; Duprez et al., 2009; Ekert et al., 1999; Green, 2000, 2003 und 2005; Orlinick und Chao, 1998; Pinkoski und Green, 2002; Thorburn, 2004

#### **Adhäsion und Migration:**

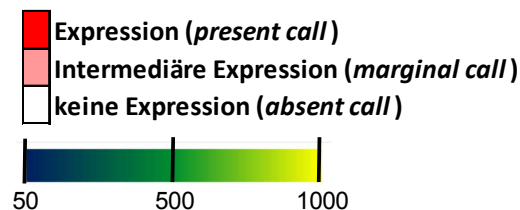
Aijaz et al., 2006; Belnoue et al., 2012; Charras und Paluch, 2008; Goodison et al., 1999; Guezguez et al., 2007; Hofmann et al., 2000; Itoh et al., 1997; McEver und Zhu, 2010; Medina et al., 2002; Nicholson, 2003; Parsons et al., 2010; Steed et al., 2010; Vestweber, 2007

#### **BZR-Signalweg:**

Dal Porto et al., 2004; DeFranco, 1997; Fu et al., 1998; Goitsuka et al., 1998; Kurosaki, 1999; Kurosaki und Kurosaki, 1997; Reth, 1989; Reth und Wienands, 1997; Scharenberg et al., 2007; Treanor, 2012; Wang und Yan, 2013; Wienands et al., 1998

## B-Zell- und Plasmazell-Marker und Sortkontrolle

		An-/Abwesenheit des Transkripts								Signalintensität								
		CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ				CD19 <sup>+</sup> KM PZ				CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ				CD19 <sup>+</sup> KM PZ				
Plasmazell-Marker und Qualitätskontrolle																		
Name des Gens	Affymetrix ID	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	FC
CD19	206398_s_at																	-11,87
CD27	206150_at																	
CD38	205692_s_at																	
SDC1 (CD138)	201287_s_at																	
XBP1	200670_at																	
IRF4	204562_at																	
PRDM1	228964_at																	
IKZF3 (Aiolos)	227030_at																	
MS4A1 (CD20)	228592_at																2,44	
CD22	38521_at																	
CD24	216379_x_at																	
PAX5	221969_at																	
PTPRC (CD45)	212588_at																	-1,67
CD3D	213539_at																	
CD3G	206804_at																	
CD3E	205456_at																	
CD4	203547_at																	
CD8A	205758_at																	
CD8B	215332_s_at																	
ZAP70	214032_at																	
CD14	201743_at																	
FCGR3B (CD16b)	204007_at																	
ITGAX (CD11c)	210184_at																	
IL3RA (CD123)	206148_at																	
NCAM1 (CD56)	212843_at																8,54	
CD34	209543_s_at																	
CEACAM8 (CD66b)	206676_at																	
MCAM (CD146)	211042_x_at																	
GYPA (CD235a)	211821_x_at																	

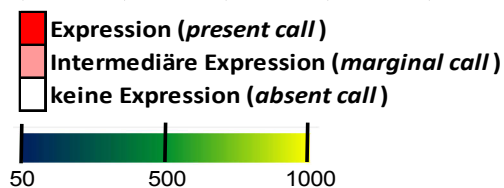


**Abb. 38: Untersuchung der Expression von Plasmazell-Markern und Markern weiterer Zelllinien in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>+</sup> KM PZ.** CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden mittels kombinierter MACS/FACS-Technik isoliert und einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse unterzogen (vgl. 2.5 und 3.1.3). Die Graphik zeigt eine Zusammenstellung von PZ-Markern und Genen, deren Expression für andere Zelllinien charakteristisch ist. Dargestellt sind die An- oder Abwesenheit der Transkripte (*present call* (rot), *absent call* (weiß) oder *marginal call* (rosa)) sowie die farbkodierte Signalstärke (siehe Farbleiste unterhalb der Graphik) in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>+</sup> KM PZ bei allen vier Donoren. Falls das entsprechende Gen in den beiden PZ-Populationen signifikant differenziell exprimiert wird, ist zusätzlich der *fold change* (FC) eines Vergleiches von CD19<sup>(-)</sup> KM PZ versus CD19<sup>+</sup> KM PZ angegeben. Positiver FC bedeutet eine stärkere Expression des Gens in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ, negativer FC zeigt eine stärkere Expression in CD19<sup>+</sup> KM PZ an. Zusätzlich sind die Affymetrix-IDs angegeben, deren Signalwerte für die Erstellung dieser Grafik verwendet wurden.

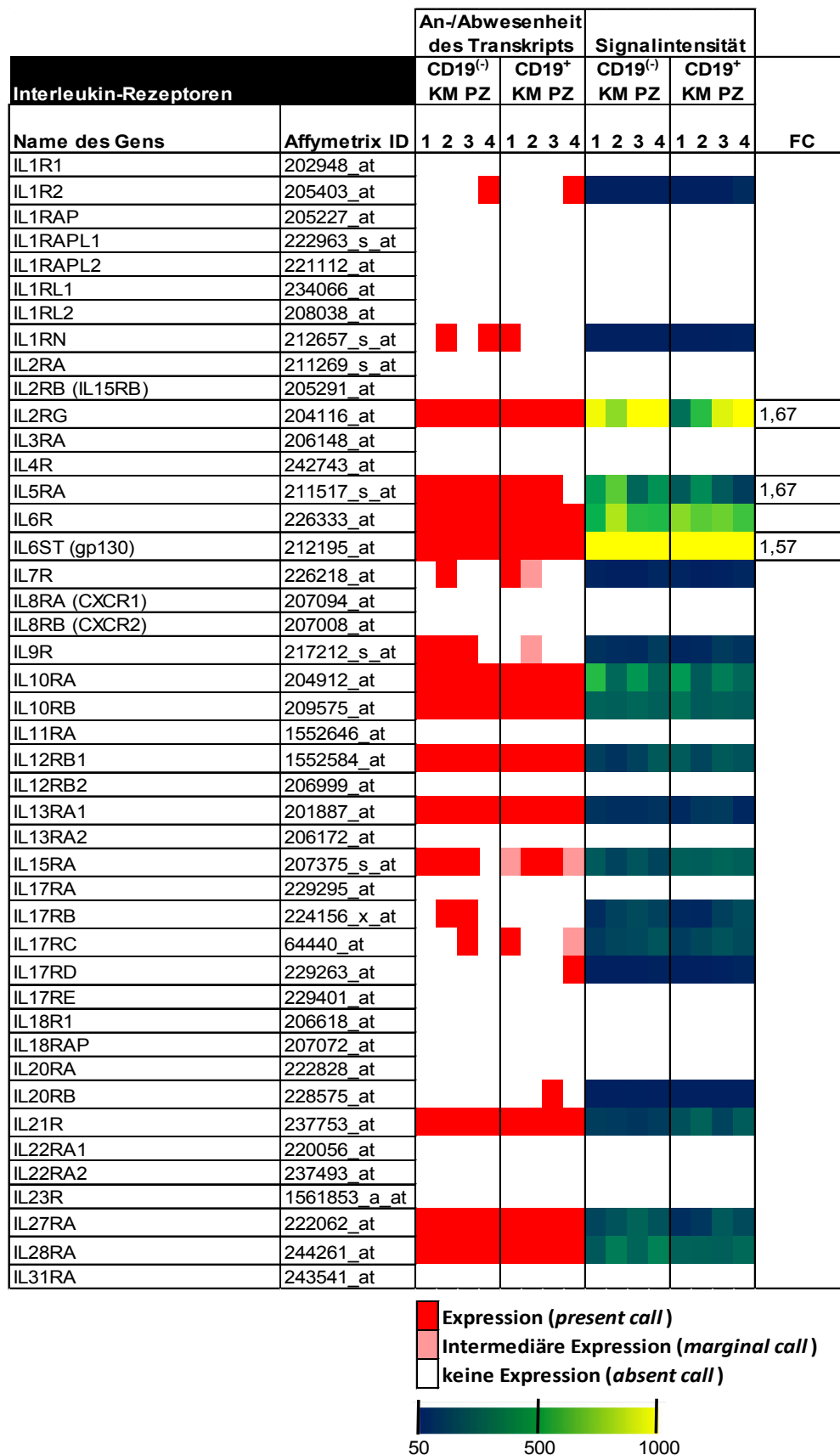


## Interleukine und Interleukin-Rezeptoren

		An-/Abwesenheit des Transkripts								Signalintensität								
Interleukine		CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ				CD19 <sup>+</sup> KM PZ				CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ				CD19 <sup>+</sup> KM PZ				
Name des Gens	Affymetrix ID	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	FC
IL1A	208200_at																	
IL1B	39402_at																	
IL1RN	212657_s_at																	
IL1F5 (IL36RN)	222223_s_at																	
IL1F6 (IL36A)	221404_at																	
IL1F7 (IL37)	224555_x_at																	
IL1F8 (IL36B)	224230_at																	
IL1F9 (IL36G)	220322_at																	
IL1F10	224262_at																	
IL2	207849_at																	
IL3	207906_at																	
IL4	207539_s_at																	
IL5	207952_at																	
IL6	205207_at																	
IL7	206693_at																	
IL8 (CXCL8)	202859_x_at																	
IL9	208193_at																	
IL10	207433_at																	
IL11	206926_s_at																	
IL12A	207160_at																	
IL12B	207901_at																	
IL13	207844_at																	
IL15	205992_s_at																	1,67
IL16	209827_s_at																	
IL17A	208402_at																	
IL17B	220273_at																	
IL17C	224079_at																	
IL17D	227401_at																	
IL17F	234408_at																	
IL18	206295_at																	
IL18BP	222868_s_at																	
IL19	220745_at																	
IL20	224071_at																	
IL21	221271_at																	
IL22	221165_s_at																	
IL23A	220054_at																	
IL24	206569_at																	
IL25 (IL17E)	220971_at																	
IL26	221111_at																	
IL27	1552995_at																	
IL28A	1552915_at																	
IL28B	1552609_s_at																	
IL29	1552917_at																	
IL32	203828_s_at																	
IL33	209821_at																	
IL34	237046_x_at																	



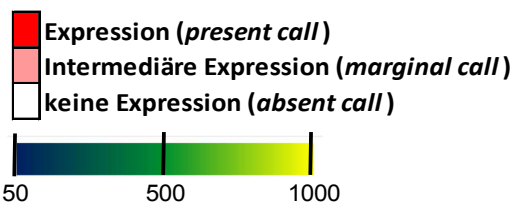
**Abb. 39: Untersuchung der Expression von Interleukinen in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>+</sup> KM PZ.** CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden mittels kombinierter MACS/FACS-Technik isoliert und einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse unterzogen (vgl. 2.5 und 3.1.3). Die Graphik zeigt eine Übersicht der bekannten Interleukine. Details siehe Legende zu Abb. 38.



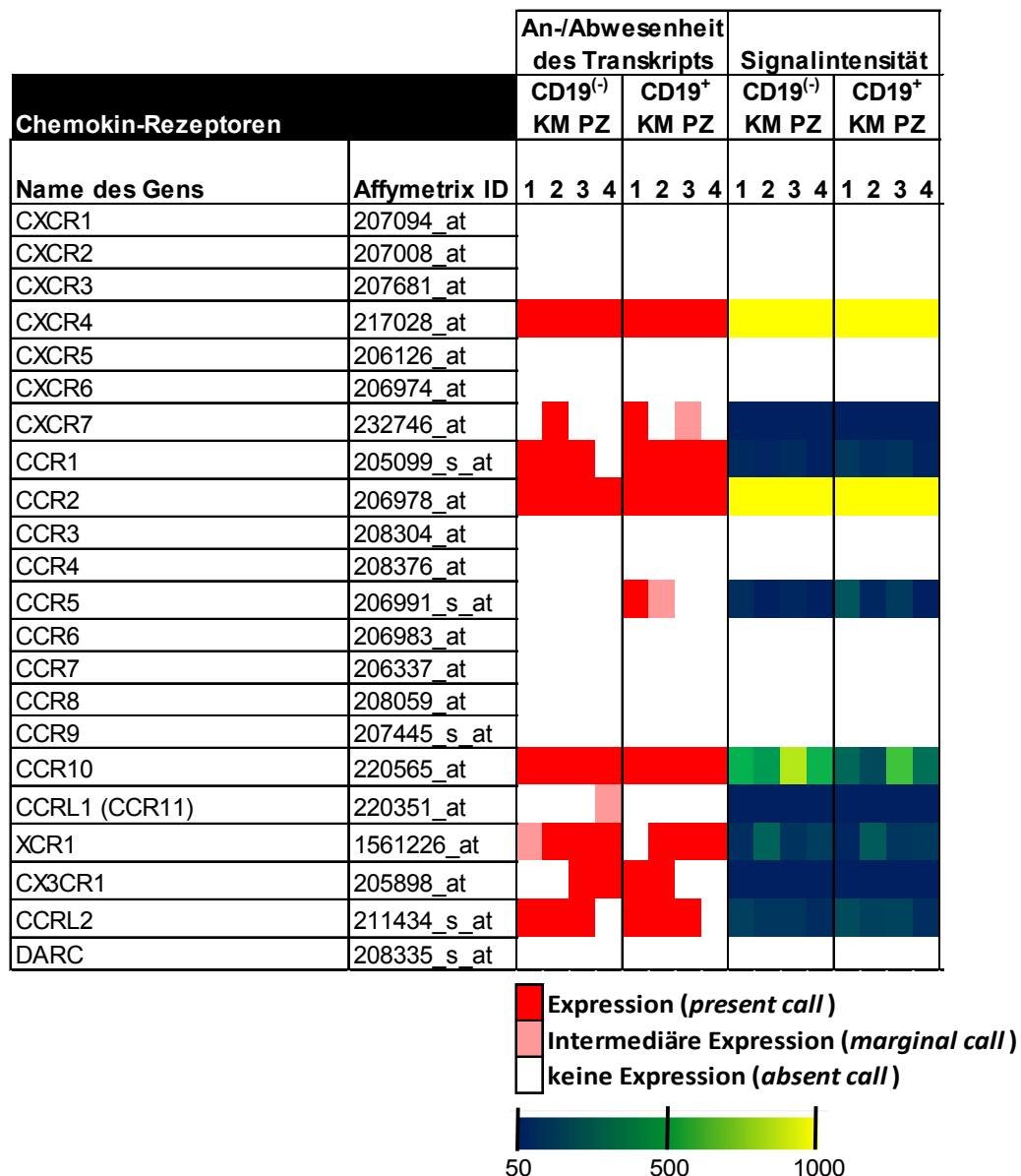
**Abb. 40: Untersuchung der Expression von Interleukin-Rezeptoren in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>+</sup> KM PZ.** CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden mittels kombinierter MACS/FACS-Technik isoliert und einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse unterzogen (vgl. 2.5 und 3.1.3). Die Graphik zeigt eine Übersicht der bekannten Interleukin-Rezeptoren. Details siehe Legende zu Abb. 38.

## Chemokine und Chemokin-Rezeptoren

		An-/Abwesenheit des Transkripts								Signalintensität								
Chemokine		CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ				CD19 <sup>+</sup> KM PZ				CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ				CD19 <sup>+</sup> KM PZ				
Name des Gens	Affymetrix ID	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	FC
CXCL1	204470_at																	
CXCL2	209774_x_at																	
CXCL3	207850_at																	
CXCL4 (PF4)	206390_x_at																	
CXCL5	215101_s_at																	
CXCL6	206336_at																	
CXCL7 (PPBP)	214146_s_at																	
CXCL8 (IL8)	202859_x_at																	
CXCL9	203915_at																	
CXCL10	204533_at																	
CXCL11	210163_at																	
CXCL12	209687_at																	
CXCL13	205242_at																	
CXCL14	237038_at																	
CXCL16	223454_at																	
CXCL17	226960_at																	
CCL1	207533_at																	
CCL2	216598_s_at																	
CCL3	205114_s_at																	1,82
CCL4	204103_at																	
CCL5	1555759_a_at																	
CCL7	208075_s_at																	
CCL8	214038_at																	
CCL11	210133_at																	
CCL13	206407_s_at																	
CCL14	205392_s_at																	
CCL15	205392_s_at																	
CCL16	207354_at																	
CCL17	207900_at																	
CCL18	209924_at																	
CCL19	210072_at																	
CCL20	205476_at																	
CCL21	204606_at																	
CCL22	207861_at																	
CCL23	210548_at																	
CCL24	221463_at																	
CCL25	206988_at																	
CCL26	223710_at																	
CCL27	207955_at																	
CCL28	224240_s_at																	
XCL1	206365_at																	
CX3CL1	823_at																	

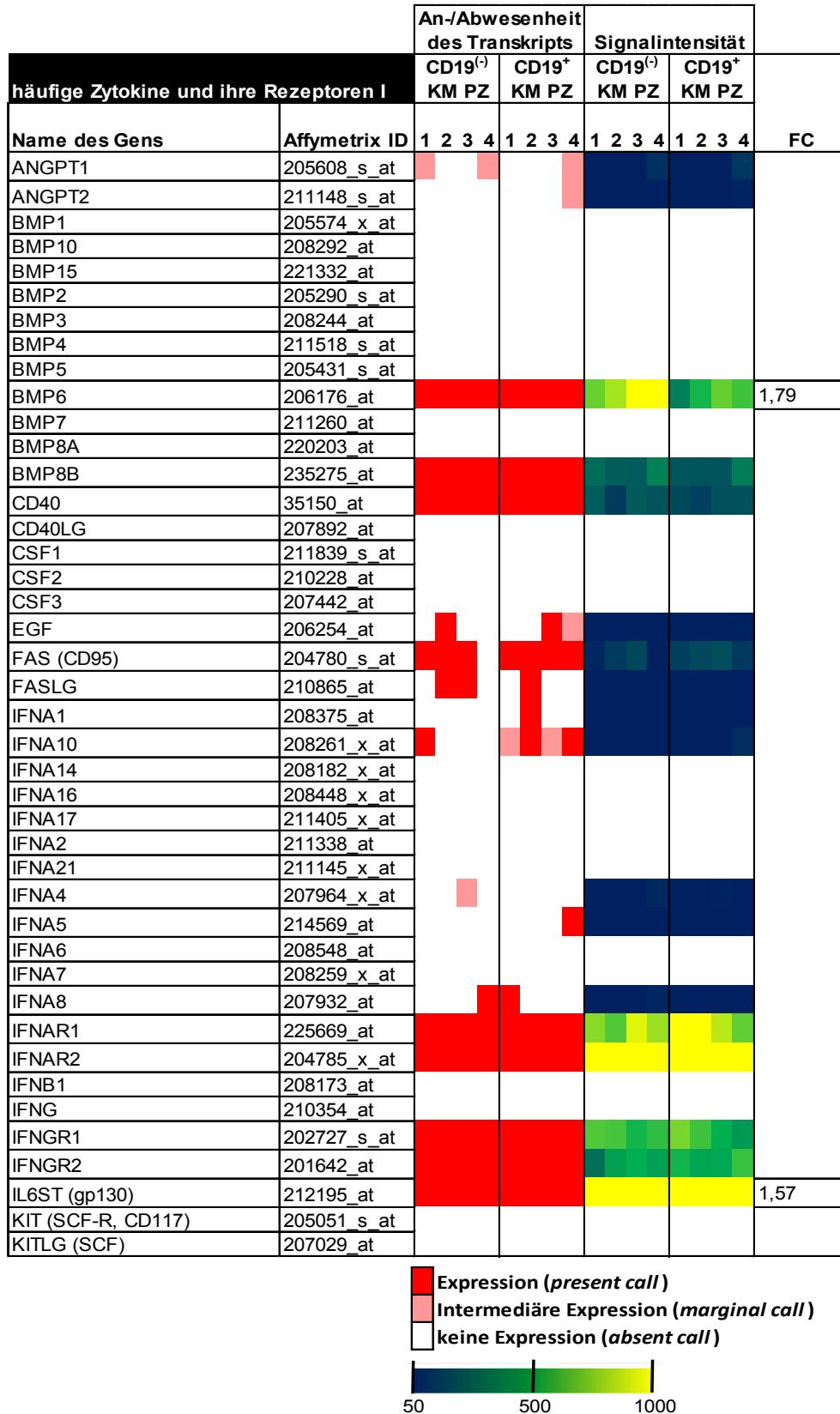


**Abb. 41: Untersuchung der Expression von Chemokinen in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>+</sup> KM PZ.** CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden mittels kombinierter MACS/FACS-Technik isoliert und einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse unterzogen (vgl. 2.5 und 3.1.3). Die Graphik zeigt eine Übersicht der bekannten Chemokine. Details siehe Legende zu Abb. 38.

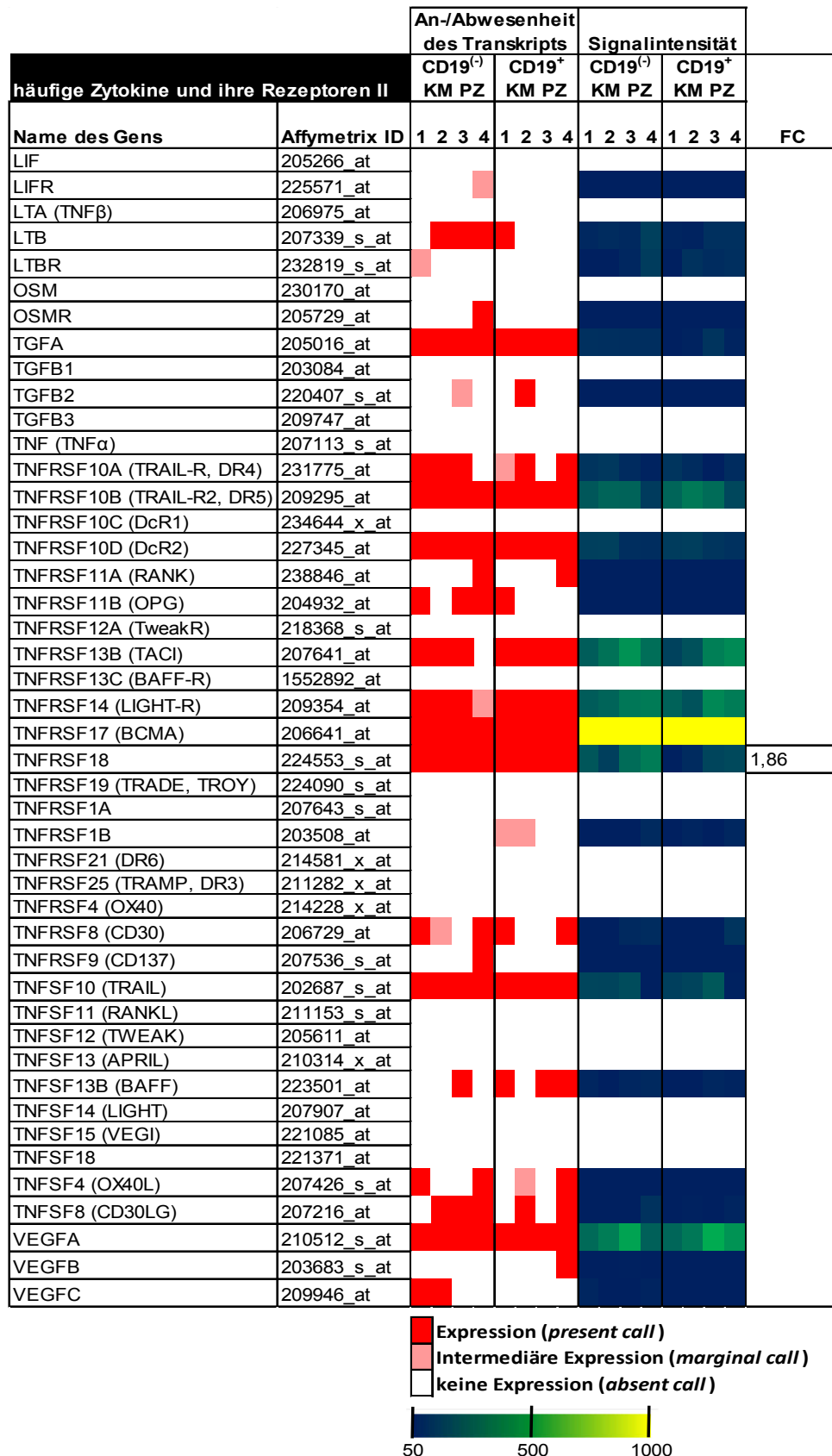


**Abb. 42: Untersuchung der Expression von Chemokin-Rezeptoren in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>+</sup> KM PZ.** CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden mittels kombinierter MACS/FACS-Technik isoliert und einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse unterzogen (vgl. 2.5 und 3.1.3). Die Graphik zeigt eine Übersicht der bekannten Chemokin-Rezeptoren. Details siehe Legende zu Abb. 38.

## Weitere Zytokine und ihre Rezeptoren



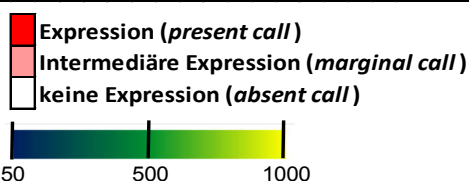
**Abb. 43: Untersuchung der Expression von Zytokinen und ihrer Rezeptoren in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>+</sup> KM PZ.** CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden mittels kombinierter MACS/FACS-Technik isoliert und einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse unterzogen (vgl. 2.5 und 3.1.3). Die Graphik zeigt eine Übersicht bekannter Zytokine und ihrer Rezeptoren. Details siehe Legende zu Abb. 38.



**Abb. 44: Fortsetzung der Abb. 43: Untersuchung der Expression von Zytokinen und ihrer Rezeptoren in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>+</sup> KM PZ.** CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden mittels kombinierter MACS/FACS-Technik isoliert und einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse unterzogen (vgl. 2.5 und 3.1.3). Die Graphik zeigt eine Übersicht bekannter Zytokine und ihrer Rezeptoren. Details siehe Legende zu Abb. 38.

## Pro-apoptotische Moleküle

		An-/Abwesenheit des Transkripts								Signalintensität								
Pro-apoptotische Moleküle		CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ				CD19 <sup>+</sup> KM PZ				CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ				CD19 <sup>+</sup> KM PZ				
Name des Gens	Affymetrix ID	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	FC
TNFRSF1A (TNFR1)	207643_s_at																	
FAS (CD95)	204780_s_at																	
TNFRSF25 (TRAMP, DR3)	211282_x_at																	
TNFRSF10A (TRAIL-R, DR4)	231775_at																	
TNFRSF10B (TRAIL-R2, DR5)	209295_at																	
TNF	207113_s_at																	
LTA	206975_at																	
FASLG (FasL)	210865_at																	
TNFSF12 (TWEAK)	205611_at																	
TNFSF10 (TRAIL)	202687_s_at																	
FADD	202535_at																	
TRADD	205641_s_at																	
CRADD (RAIDD)	209833_at																	
APAF1	204859_s_at																	
TRAF2	204413_at																	
RIPK1 (RIP1)	226551_at																	
DAXX	216038_x_at																	
CASP2	226032_at																	
CASP3	202763_at																	
CASP6	211464_x_at																	
CASP7	207181_s_at																	
CASP8 (FLICE, MACH)	213373_s_at																	
CASP9	203984_s_at																	
CASP10	205467_at																	
BAD	209364_at																	
BAK1	203728_at																	
BAX	208478_s_at																	
BID	227143_s_at																	
BIK	205780_at																	
BCL2L11 (Bim)	225606_at																	
BLK	206255_at																	
BMF	226530_at																	
BOK	223349_s_at																	
BNIP3	201849_at																	
BBC3 (Puma)	211692_s_at																	
PMAIP1 (Noxa)	204285_s_at																	
HRK (Harakiri, DP5)	206864_s_at																	
AIFM1 (AIF)	205512_s_at																	
HTRA2 (Omi)	203089_s_at																	
DIABLO (SMAC)	219350_s_at																	
ENDO G	204824_at																	
BCL2L10 (Boo, Diva)	236491_at																	
MAP3K5 (ASK1)	203837_at																	1,82
TP53	201746_at																	
PERP	222392_x_at																	1,70
MYC	202431_s_at																	



**Abb. 45 (umseitig): Untersuchung der Expression pro-apoptotischer Moleküle in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>+</sup> KM PZ.** CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden mittels kombinierter MACS/FACS-Technik isoliert und einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse unterzogen (vgl. 2.5 und 3.1.3). Die Graphik zeigt eine Zusammenstellung pro-apoptotischer Moleküle (Referenzen siehe S. 163). Details siehe Legende zu Abb. 38.

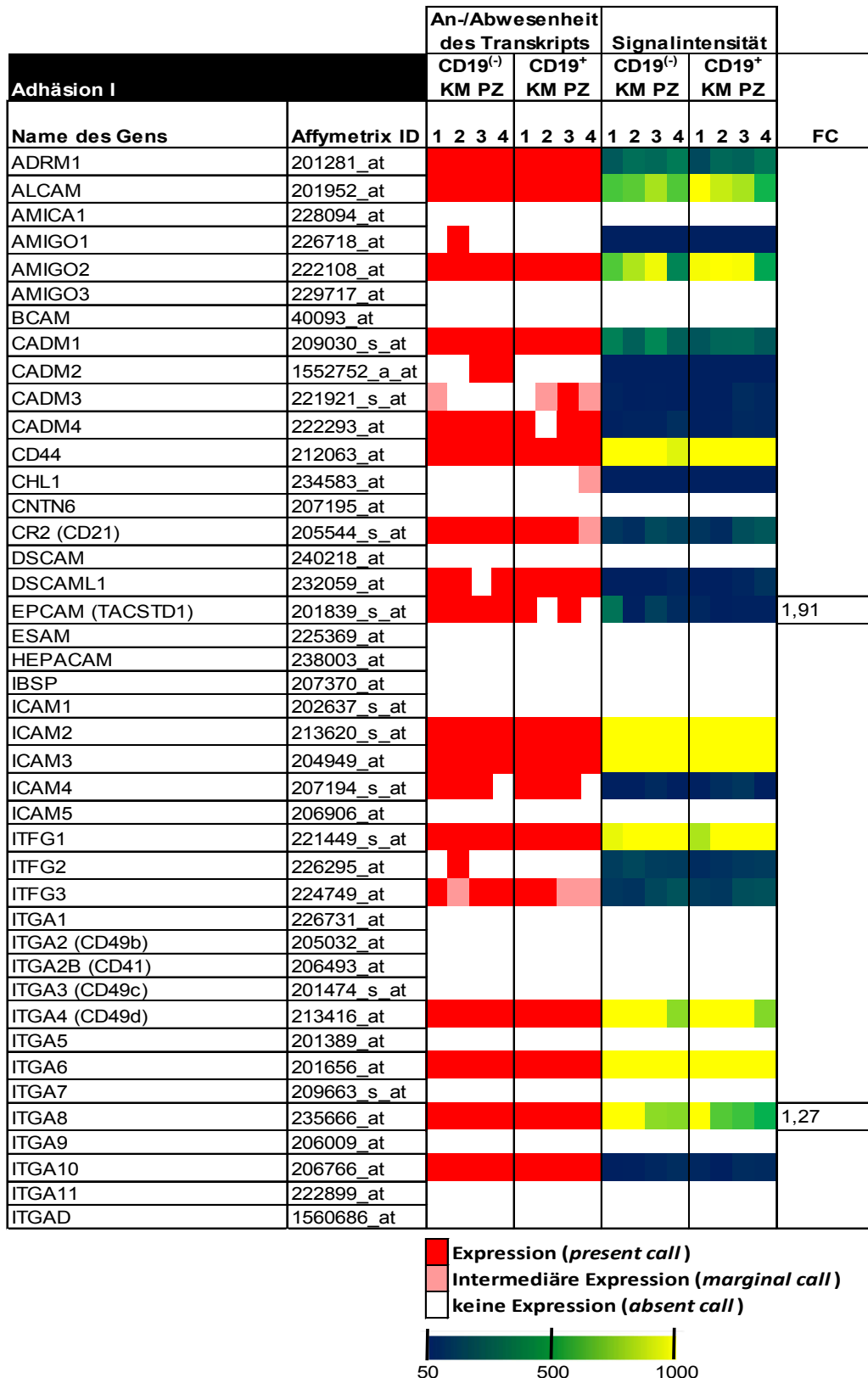
## Anti-apoptotische Moleküle

		An-/Abwesenheit des Transkripts								Signalintensität								
Anti-apoptotische Moleküle		CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ				CD19 <sup>+</sup> KM PZ				CD19 <sup>(-)</sup> KM PZ				CD19 <sup>+</sup> KM PZ				
Name des Gens	Affymetrix ID	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	FC
BIRC2 (c-IAP1)	202076_at																	1,94
BIRC3 (c-IAP2)	210538_s_at																	
XIAP (BIRC4)	228363_at																	
NAIP (BIRC1)	204861_s_at																	
BIRC5 (Survivin)	202094_at																	
BIRC6 (BRUCE)	233093_s_at																	1,54
BCL2	232210_at																	
BCL2L1 (Bcl-XL)	212312_at																	
BCL2L2 (Bcl-W)	209311_at																	1,54
MCL1	241722_x_at																	
BCL2A1 (Bfl-1)	205681_at																	
TNFRSF10C (DcR1)	234644_x_at																	
TNFRSF10D (DcR2)	227345_at																	
CFLAR (c-FLIP, Casper)	209939_x_at																	1,54
FAIM	220643_s_at																	
BNIP3L	221478_at																	

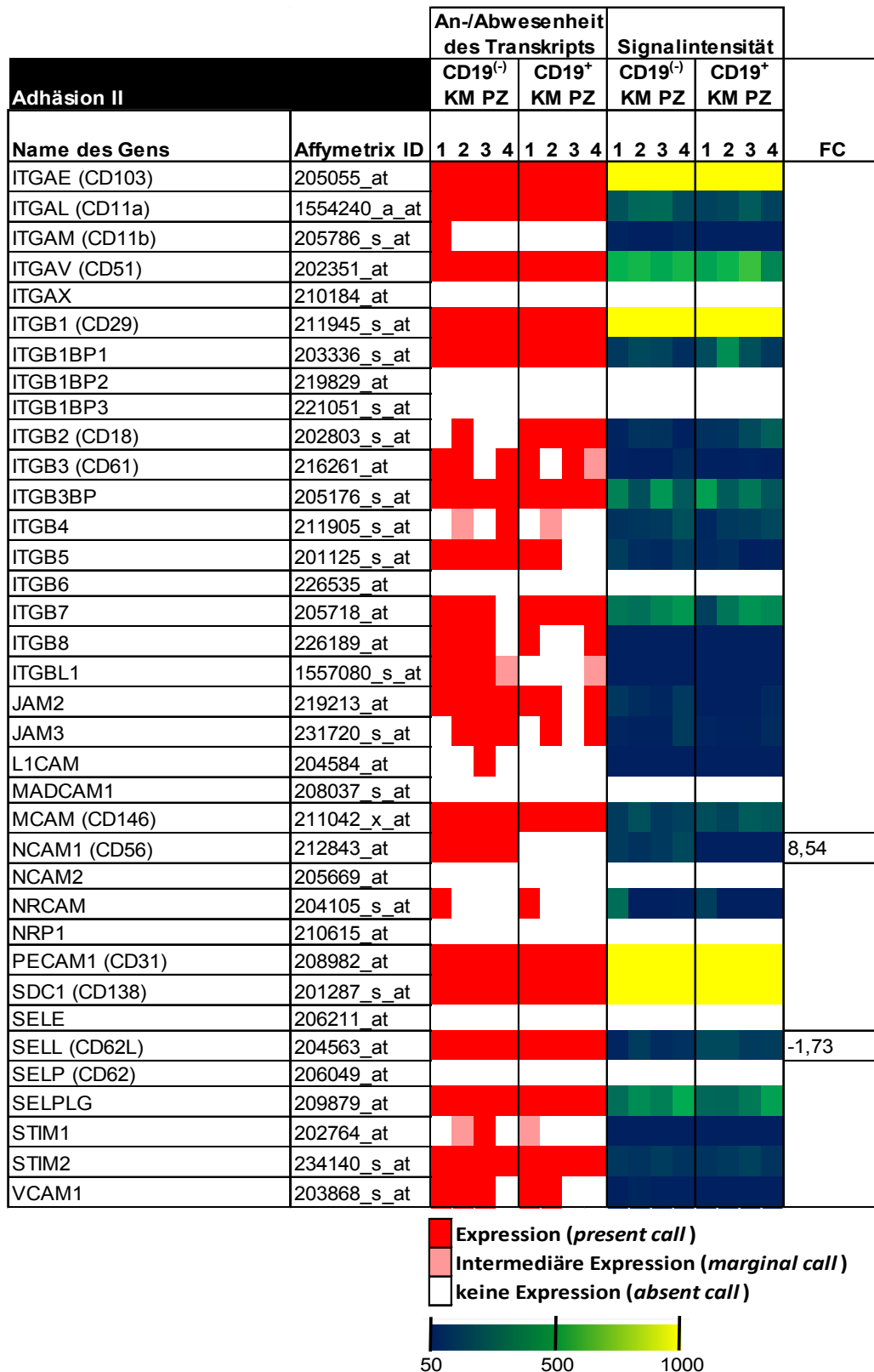
**Abb. 46: Untersuchung der Expression antiapoptotischer Moleküle in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>+</sup> KM PZ.** CD19<sup>+</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden mittels kombinierter MACS/FACS-Technik isoliert und einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse unterzogen (vgl. 2.5 und 3.1.3). Die Graphik zeigt eine Zusammenstellung antiapoptotischer Moleküle (Referenzen siehe S. 163). Details siehe Legende zu Abb. 38.



## Adhäsionsmoleküle



**Abb. 47: Untersuchung der Expression von Adhäsionsmolekülen in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>(+)</sup> KM PZ.** CD19<sup>(+)</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden mittels kombinierter MACS/FACS-Technik isoliert und einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse unterzogen (vgl. 2.5 und 3.1.3). Die Graphik zeigt eine Zusammenstellung von Adhäsionsmolekülen (Referenzen siehe S. 163). Details siehe Legende zu Abb. 38.



**Abb. 48: Fortsetzung der Abb. 47: Untersuchung der Expression von Adhäsionsmolekülen in CD19<sup>(-)</sup> KM PZ und CD19<sup>(+)</sup> KM PZ.** CD19<sup>(+)</sup> und CD19<sup>(-)</sup> KM PZ von vier Donoren wurden mittels kombinierter MACS/FACS-Technik isoliert und einer Affymetrix-Genexpressionsanalyse unterzogen (vgl. 2.5 und 3.1.3). Die Graphik zeigt eine Zusammenstellung von Adhäsionsmolekülen (Referenzen siehe S. 163). Details siehe Legende zu Abb. 38.

## Publikationen

- Giesecke, C., Frölich, D., Reiter, K., Mei, H.E., **Wirries, I.**, Kuhly, R., Killig, M., Glatzer, T., Stolzel, K., Perka, C., *et al.* (2014). Tissue distribution and dependence of responsiveness of human antigen-specific memory B cells. *Journal of immunology* 192, 3091-3100.
- Mei, H.E., **Wirries, I.**, Frölich, D., Brisslert, M., Giesecke, C., Grun, J.R., Alexander, T., Schmidt, S., Luda, K., Kuhl, A.A., *et al.* (2015). A unique population of IgG-expressing plasma cells lacking CD19 is enriched in human bone marrow. *Blood* 125, 1739-1748.
- Porstner, M., Winkelmann, R., Daum, P., Schmid, J., Pracht, K., Corte-Real, J., Schreiber, S., Haftmann, C., Brandl, A., Mashreghi, M.F., Gelse, K., Hauke, M., **Wirries, I.**, Zwick, M., Roth, E., Radbruch, A., Wittmann, J., Jäck, H.M. (2015). miR-148a promotes plasma cell differentiation and targets the germinal center transcription factors *Mitf* and *Bach2*. *European journal of immunology* 45, 1206-1215.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zur Promotion unterstützt haben:

Thomas Dörner und Andreas Radbruch danke ich für die Betreuung und die Möglichkeit, diese Arbeit an der Charité und im DRFZ anfertigen zu können. Ich danke ihnen auch für die Bereitschaft zur Diskussion, die konstruktive Kritik und die Durchsicht der Dissertation.

Henrik Mei danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die Einführung in das Thema, die stetige Diskussionsbereitschaft, die Überlassung der Genexpressionsdaten und den kritischen Blick auf diese Arbeit.

Mein Dank gilt auch Hans-Martin Jäck für die Übernahme des Drittgutachtens sowie dafür, dass er meine Begeisterung für die Immunologie und insbesondere für B-Zellen und Plasmazellen entfacht hat.

Für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor, das herzliche Miteinander, für Motivation und fachliche Diskussionen danke ich den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe: Capucine Daridon, Sarah Fleischer, Vanessa Fleischer, Daniela Frölich, Claudia Giesecke, Marie Lettau, Kasia Luda, Karin Reiter und Annika Wiedemann.

Außerdem danke ich Joachim Grün für die Zusammenarbeit bei der Auswertung der Genexpressionsdaten.

Großer Dank gilt allen Kooperationspartnern für die Überlassung von Probenmaterial: Carsten Perka und den Ärzten der Klinik für Orthopädie der Charité sowie der Chirurgischen Klinik am Campus Virchow der Charité, Simon Reinke und Antje Blankenstein vom BCRT, Karin Schwarz aus der Abteilung für Kinderneurochirurgie der Charité und der Arbeitsgruppe von Chiara Romagnani vom DRFZ.

Darüber hinaus danke ich allen, die bei der Tetanus-Vakzinierungsstudie mitgewirkt haben, sowie allen freiwilligen Blutspendern und Blutabnehmern.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich herzlich für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Motivation.

Besonderer Dank gilt Sebastian für seine Ermutigung, Geduld und Toleranz und den Rückhalt, den er mir gibt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Literaturquellen angefertigt zu haben.

Ferner erkläre ich, dass ich keine anderen Promotionen oder Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät angenommen oder abgelehnt worden ist.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung vom 06. Juli 2009 der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.